



Synthèse de nouvelles sondes moléculaires marquées au fluor-18 pour l'imagerie de la neuroinflammation par Tomographie par Emission de Positons

Vincent Médran-Navarrete

► To cite this version:

Vincent Médran-Navarrete. Synthèse de nouvelles sondes moléculaires marquées au fluor-18 pour l'imagerie de la neuroinflammation par Tomographie par Emission de Positons. Radiochimie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112097 . tel-01330650

HAL Id: tel-01330650

<https://theses.hal.science/tel-01330650>

Submitted on 12 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Paris-Sud
Ecole doctorale Chimie Paris-Sud

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Discipline : **CHIMIE**

**Synthèse de nouvelles sondes moléculaires marquées
au fluor-18 pour l'imagerie de la neuroinflammation
par Tomographie par Emission de Positons**

Par

Vincent MEDRAN-NAVARRETE

Service Hospitalier Frédéric Joliot, Laboratoire de Radiochimie et de Radiopharmacie

Thèse soutenue publiquement le 11 Juin 2014,
devant le jury composé de :

Pr. David Aitken (Université Paris-Sud) - Examineur

Pr. Xavier Pannecoucke (INSA de Rouen) - Rapporteur

Dr. Didier Lebars (Université de Lyon) - Rapporteur

Pr. Jean-Michel Chezal (Université d'Auvergne) - Examineur

Dr. Frédéric Dollé (CEA) - Directeur de thèse

Dr. Annelaure Damont (CEA) - Examinatrice



Université Paris-Sud
Ecole doctorale Chimie Paris-Sud

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Discipline : **CHIMIE**

**Synthèse de nouvelles sondes moléculaires marquées
au fluor-18 pour l'imagerie de la neuroinflammation
par Tomographie par Emission de Positons**

Par

Vincent MEDRAN-NAVARRETE

Service Hospitalier Frédéric Joliot, Laboratoire de Radiochimie et de Radiopharmacie

Thèse soutenue publiquement le 11 Juin 2014,
devant le jury composé de :

Pr. David Aitken (Université Paris-Sud) - Examineur

Pr. Xavier Pannecoucke (INSA de Rouen) - Rapporteur

Dr. Didier Lebars (Université de Lyon) - Rapporteur

Pr. Jean-Michel Chezal (Université d'Auvergne) - Examineur

Dr. Frédéric Dollé (CEA) - Directeur de thèse

Dr. Annelaure Damont (CEA) - Examinatrice

« *L'imagination est plus importante que le savoir.* »

Albert Einstein (1879-1955)

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'unité de chimie et de radiochimie du Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), à Orsay, du 11 Octobre 2011 au 10 Avril 2014. Partie intégrante du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), ce laboratoire conduit ses activités de recherche dans le cadre de l'école doctorale Chimie Paris-Sud de l'Université Paris-Sud.

Avant d'exposer le travail qui a conduit à ce mémoire, je tiens à remercier celles et ceux qui ont permis sa réalisation dans les meilleures conditions. Je voudrais d'abord exprimer toute ma gratitude envers mon directeur de thèse, **Frédéric Dollé**, pour m'avoir accepté au sein de son équipe de recherche. Frédéric s'est toujours montré à l'écoute et m'a prodigué des conseils avisés pour faire avancer mes recherches efficacement. Il a par ailleurs activement participé à la relecture et à la correction de ce manuscrit.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à **Annelaure Damont** qui a encadré mes recherches au laboratoire. Annelaure m'a fait profiter de son expérience de la chimie expérimentale avec beaucoup d'enthousiasme et de pédagogie. Elle s'est également fortement impliquée dans la relecture et la correction de ce manuscrit.

Je remercie ensuite les autres membres du laboratoire et tout particulièrement **Bertrand Kuhnast** et **Alex Ching Sik-chung** qui ont mis au point et réalisé les radiomarquages au fluor-18. Un grand merci aussi à **Stéphane Demphel** et surtout à **Stéphane Le Helleix** pour la gestion des commandes de produits chimiques. Je remercie également **Fabien Caillé** (qui a rejoint le laboratoire en toute fin de ma thèse) et Bertrand pour le temps qu'ils ont consacré à la relecture de ce manuscrit et pour la pertinence de leurs remarques. Tous mes vœux aussi de réussite et de succès à **Fanny Cacheux**, avec qui j'ai partagé de nombreuses heures dans le laboratoire et qui devrait être dans ma situation dans une trentaine de mois.

Un merci également aux membres de l'équipe « cyclotron », **Daniel Gouel**, **Christophe Lechêne** et **Tony Catarina**, qui ont produit les lots de fluor-18 nécessaires aux radiosynthèses.

Le potentiel *in vivo* des molécules synthétisées n'aurait pas pu être découvert sans les contributions de **Raphaël Boisgard**, **Géraldine Pottier** et **Nicholas Bernards** pour les autoradiographies et l'imagerie par TEP et de **Marie-Anne Peyronneau** pour les premières études de métabolisme. Les évaluations des affinités et sélectivités *in vitro* ont quant à elles été réalisées dans le cadre d'un partenariat du laboratoire avec SANOFI (**Frank Marguet** et **Frédéric Puech**). Qu'ils trouvent tous ici l'expression de toute ma reconnaissance pour leur travail !

Enfin, je remercie vivement le CEA pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail dans un environnement exceptionnel et tout particulièrement la Direction des sciences du vivant pour le financement accordé suite au concours de sélection interne IRTÉLIS.

Je suis également sincèrement reconnaissant à Messieurs Didier Lebars et Xavier Pannecoucke, pour avoir accepté, en tant que rapporteurs, de consacrer de leur temps à la critique des travaux décrits dans ce mémoire et remercie Messieurs David Aitken et Jean-Michel Chezal pour leur participation à ce jury de thèse.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a soutenu tout au long de ma thèse !



L'équipe de Chimie et Radiochimie (de la gauche vers la droite): Stéphane Demphel, Cyrielle Le Taillandier, Bertrand Kuhnast, Marie-Anne Peyronneau, Vincent Médran-Navarrete, Annelaure Damont, Stéphane Le Helleix, Fanny Cacheux et Frédéric Dollé. Photo prise avant la prise de fonction de Fabien Caillé (16/12/2013).

Abréviations et symboles

Ac	acétyle
AcOEt	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
AIBN	azobis(isobutyronitrile)
Aq.	aqueux / aqueuse
CAN	cerium ammonium nitrate
cat.	quantité catalytique
CCM	chromatographie sur couche mince
CE	capture électronique
DAST	diéthylaminosulfur trifluoride (trifluorure de diéthylaminosulfure)
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCM	dichlorométhane
DCY	decay-corrected yield (rendement corrigé de la décroissance)
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMAP	<i>N,N</i> -diméthyl-4-aminopyridine
DME	diméthoxyéthane
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMBn	2,4-diméthoxybenzyle
DMTr	di(4-méthoxyphényl)phénylméthyle ou diméthoxytrityle
DMSO	diméthylsulfoxyde
EDG	electron donating group (groupement électro-donneur)
EOB	end of bombardment (fin de bombardement)
EOS	end of synthesis (fin de (radio)synthèse)
Et	éthyle
eq.	équivalent
ESI	electrospray ionization (ionisation par électrospray)
EWG	electron withdrawing group (groupement électro-attracteur)
GP	groupement protecteur
FDG	2-fluoro-2-désoxy-D-glucose
HPLC	high performance liquid chromatography (chromatographie liquide haute performance)
HRMS	high resolution mass spectrometry (spectrométrie de masse haute résolution)
IC ₅₀	concentration inhibant 50 % de la liaison ligand-récepteur
IRM	imagerie par résonance magnétique
J	constante de couplage (Hz)
K _{2.2.2}	4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane
LAH	aluminohydrure de lithium
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -chloroperbenzoic acid (acide <i>meta</i> -chloroperbenzoïque)

Me	méthyle
MS	mass spectrometry (spectrométrie de masse)
Ms	mésyle (méthylsulfonyle)
Ns	nosyle (4-nitrobenzènesulfonyle)
Nu	nucléophile
NMR	nuclear magnetic resonance (résonance magnétique nucléaire)
Pd/C	palladium sur charbon
Ph	phényle
Py	pyridine
ppm	partie par million
quant.	quantitatif
RAS	radioactivité spécifique
RCY	radiochemical yield (rendement radiochimique)
R _f	rapport frontal
refl	reflux
r.t.	room temperature (température ambiante)
Sia	siamyle (1,2-diméthylpropyle)
S _N 1	substitution nucléophile d'ordre 1
S _N 2	substitution nucléophile d'ordre 2
t _{1/2}	période radioactive d'un radioélément / radioisotope
Thx	théxyle (1,1,2-triméthylpropyle)
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBDPS	<i>tert</i> -tributyldiphénylsilyle
tBu	<i>tert</i> -butyle
TEA	triéthylamine
TEP	tomographie par émission de positons
Tf	trifluorométhanesulfonyle
THF	tétrahydrofurane
TFA	acide trifluoroacétique
TMS	triméthylsilyle
Ts	tosyle (4-méthylbenzènesulfonyle)

Table des matières

Remerciements	2
Abréviations et symboles	7
Table des matières	9
Liste des figures	14
Liste des schémas	15
Liste des tableaux	18
Avant-propos	19
PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION ET GENERALITES	25
Chapitre 1: Notions de radioactivité.....	26
1. Découverte de la radioactivité	27
2. Les différents modes de désintégration nucléaire	28
2.1. Rappel sur la structure de l'atome	28
2.2. Rayonnement α	29
2.3. Rayonnement β	30
2.4. Rayonnement γ	32
2.5. Rayons X	32
2.6. Fission spontanée	33
3. Grandeurs et unités	33
3.1. Activité	33
3.2. Période radioactive	34
3.3. Radioactivité spécifique	34
Chapitre 2: La médecine nucléaire et la Tomographie par Emission de Positons	35
1. La médecine nucléaire.....	35
2. La Tomographie par Emission de Positons	36
2.1. Champs d'application.....	36
2.2. Principe physique	36
2.3. Performances de la Tomographie par Emission de Positons.....	37
2.4. Production des émetteurs de positons.....	37
Chapitre 3: Le fluor-18	39
1. Modes d'obtention du fluor-18.....	39
1.1. Production de fluor-18 électrophile.....	39
1.2. Production de fluor-18 nucléophile	40
2. La radiochimie du fluor-18.....	41
2.1. Réactions de substitution nucléophile	41
2.1.1. Réactions de substitution nucléophile en série aliphatique	41
2.1.1.1. Réactivité des sulfonates	41
2.1.1.1.1. Réactivité des tosylates.....	42
2.1.1.1.2. Réactivité des mésylates.....	43
2.1.1.1.3. Réactivité des nosylates.....	44

2.1.1.1.4. Réactivité des triflates	45
2.1.1.2 Réactivité des halogénures d'alkyles	47
2.1.2. Réactions de substitution nucléophile en série aromatique	47
2.1.2.1. Réactivité des fluorures d'aryle.....	47
2.1.2.2. Réactivité des nitroarènes.....	48
2.1.2.3. Réactivité des sels d'ammonium quaternaire	49
2.1.2.4. Réactivité des sels d'iodonium.....	50
2.2. Réactions d'addition électrophile aromatique	51
Chapitre 4: La protéine de translocation 18 kDa	53
1. Description de la protéine TSPO 18 kDa	53
1.1. Structure de la protéine.....	53
1.2. Fonctions biologiques.....	53
1.3. Intérêt de la protéine TSPO 18 kDa en imagerie médicale	54
2. Les radioligands de la protéine TSPO 18 kDa	54
2.1. Benzodiazépines.....	54
2.2. Isoquinoléine carboxamides	55
2.3. Phénoxyaryl acétamides	56
2.4. Alcaloïdes de Vinca.....	57
2.5. Aryl-oxodihydropurines	58
2.6. Imidazopyridines et pyrazolopyrimidines	58
2.7. Indole acétamides	61
Chapitre 5: Le projet de thèse.....	62
1. Les ligands de la TSPO 18 kDa du type pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidine acétamides - Développements antérieurs	62
2. Enjeux de la thèse.....	65
3. Le projet de thèse dans son ensemble.....	66
4. Structure du projet de recherche en chimie	67
DEUXIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	69
Chapitre 1: Dérivés de DPA-714 modifiés en position <i>para</i> du noyau phényle	70
1. Analogues alcanes et alcynes	71
1.1. Cibles synthétiques.....	71
1.2. Première approche envisagée pour la synthèse des analogues C3ane et C3yne.....	71
1.2.1. Stratégie de synthèse	71
1.2.2. Résultats obtenus pour la préparation des analogues C3yne et C3ane avec la première approche.....	72
1.2.2.1. Couplage de Sonogashira - Introduction du motif propargylique	72
1.2.2.2. Cyanylation - 1 ^{ère} étape de la construction du cycle pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidine.....	73
1.2.2.3. C-Alkylation - Introduction du motif <i>N,N</i> -diéthylacétamide	74
1.2.2.4. Cyclisation I - Formation du cycle aminopyrazole	75
1.2.2.5. Cyclisation II - Formation du cycle pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidine	76
1.2.2.6. Déprotection - Libération de l'alcool propargylique.....	76

1.2.2.7. Déhydroxyfluoruration - Introduction du fluor.....	77
1.2.2.8. Synthèse de l'analogue C3ane.....	78
1.2.3. Schéma de synthèse final de l'analogue C3ane (10)	79
1.3. Approche alternative pour la synthèse des autres analogues alcanes et alcynes	80
1.3.1. Stratégie de synthèse envisagée.....	80
1.3.2. Résultats obtenus avec la deuxième stratégie de synthèse	81
1.3.3. Schéma de synthèse final des analogues alcynes et alcanes C4, C5 et C6.....	82
1.3.4. Conclusion sur la synthèse des analogues alcynes et alcanes C4, C5 et C6 avec l'approche alternative	83
1.4. Synthèse de l'analogue alcyne C3yne	83
1.4.1. Stratégie de synthèse envisagée.....	83
1.4.2. Résultats obtenus pour la synthèse de l'analogue C3yne	84
1.4.3. Schéma de synthèse final de l'analogue C3yne.....	85
1.4.4. Conclusion sur la synthèse de l'analogue C3yne	86
1.5. Cas de l'analogue alcane C2ane.....	86
1.5.1. Stratégie de synthèse par hydroboration oxydante	87
1.5.2. Résultats de la stratégie de synthèse par hydroboration oxydante	87
1.5.3. Résultats de la stratégie de synthèse par époxydation	90
1.5.4. Conclusion sur la préparation de l'analogue C2ane	90
2. Analogues alcènes.....	90
2.1. Cibles synthétiques.....	90
2.2. Axes de recherches envisagés pour la synthèse des analogues alcènes.....	91
2.3. Axe de recherche A: synthèse totale	92
2.3.1. Stratégies de synthèse de l'analogue C3ène	92
2.3.2. Résultats obtenus avec la méthode « Wittig ».....	92
2.3.3. Résultats obtenus avec la méthode « Knœvenagel ».....	93
2.4. Axe de recherche B: couplages métallo-catalysés.....	95
2.4.1. Stratégies de synthèse envisagées	95
2.4.2. Résultats obtenus pour la stratégie « Grubbs ».....	96
2.4.3. Résultats obtenus pour la stratégie d'hydrostannylation	97
2.5. Axe de recherche C: hydrogénation d'un dérivé DPA alcyne.....	103
2.5.1. Stratégie de synthèse envisagée.....	103
2.5.2. Résultats obtenus avec l'hydrogénation partielle d'alcyne	103
2.6. Conclusion sur la série alcène	104
3. Analogue phényle.....	105
3.1. Cible synthétique.....	105
3.2. Stratégie de synthèse de l'analogue phényle	105
3.3. Résultats obtenus pour la synthèse de l'analogue phényle.....	105
4. Evaluation physico-chimique, pharmacologique et métabolique <i>in vitro</i>	106
4.1. Série alcyne	106
4.2. Série alcane.....	109

4.3. Série phényle	111
5. Synthèse des précurseurs de radiomarquage	111
5.1. Série alcyne	111
5.1.1. Cible synthétique	111
5.1.2. Stratégie de synthèse du précurseur de marquage de [¹⁸ F]DPA-C5yne	112
5.1.3. Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage de [¹⁸ F]DPA-C5yne... ..	112
5.2. Série alcane.....	114
5.2.1. Cible synthétique	114
5.2.2. Stratégie de synthèse du précurseur de marquage de [¹⁸ F]CfO-DPA-714	114
5.2.3. Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage de [¹⁸ F]CfO-DPA-714	114
5.3. Série phényle	115
5.3.1. Stratégies de synthèse du précurseur de marquage de [¹⁸ F]F-DPA.....	115
5.3.2. Résultats obtenus pour le précurseur de marquage nitré	116
5.3.3. Résultats obtenus pour le précurseur de marquage trialkylétain	117
5.3.4. Résultats obtenus pour le précurseur iodonium.....	118
5.3.5. Résultats obtenus pour le précurseur de marquage ammonium quaternaire	119
5.3.5.1. Synthèse à partir de I-DPA.....	119
5.3.5.2. Synthèse à partir d'une amine commerciale.....	121
6. Radiomarquage au fluor-18.....	122
6.1. Présentation du module de radiosynthèse TRACERLab FX N Pro	122
6.2. Radiomarquage de [¹⁸ F]DPA-C5yne.....	123
6.3. Radiomarquage de [¹⁸ F]CfO-DPA-714	125
7. Autoradiographie <i>in vitro</i> et imagerie TEP <i>in vivo</i>	125
7.1. Série alcyne	125
7.1.1. Autoradiographie <i>in vitro</i> de [¹⁸ F]DPA-C5yne	125
7.1.2. Imagerie TEP <i>in vivo</i> de [¹⁸ F]DPA-C5yne	126
7.2. Série alcane.....	127
7.2.1. Autoradiographie <i>in vitro</i> de [¹⁸ F]CfO-DPA-714.....	127
7.2.2. Imagerie TEP <i>in vivo</i> de [¹⁸ F]CfO-DPA-714	128
Chapitre 2: Dérivés de CfO-DPA-714 modifiés au niveau de la fonction amide	129
1. Analogues amides.....	129
1.1. Cibles synthétiques.....	129
1.2. Stratégie de synthèse des analogues amides.....	130
1.3. Résultats obtenus pour la stratégie de synthèse des analogues amides	130
1.4. Cas particulier de l'analogue <i>N</i> -méthylcyclopropylamine	135
2. Synthèse des précurseurs de radiomarquage au fluor-18	137
2.1. Stratégie de synthèse des précurseurs de radiomarquage amides.....	137
2.2. Résultats de la stratégie de synthèse des précurseurs amides.....	138
TROISIEME PARTIE: CONCLUSION ET PERSPECTIVES	141
FOURTH PART: EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	145

Chapter 1: Organic synthesis	146
1. General information	147
1.1. Chemicals	147
1.2. TLC analysis and flash chromatography	147
1.3. HPLC system and condition	147
1.4. Spectroscopic analyses	148
2. Experimental procedures	149
Chapter 2: Radiochemistry	233
1. General information	233
1.1. HPLC systems and conditions	233
1.2. Radioisotope production	233
2. Production of the radiotracers	234
2.1. Description of the radiosynthesizers	234
2.1.1. The TRACERLab FX N Pro	234
2.1.1.1. Radiosynthesizer description and sequences used	234
2.1.1.2. Radiosynthesizer configuration	234
2.1.1.3. Radiosynthesizer preparation	236
2.1.2. The TRACERLab FX FN	236
2.1.2.1. Radiosynthesizer description and sequences used	236
2.1.2.2. Radiosynthesizer configuration	238
2.1.2.3. Radiosynthesizer preparation	238
2.2. Radiosynthesis, purification and formulation	238
2.2.1. Radiosynthesis of [¹⁸ F]DPA-C5yne ([¹⁸ F]- 16c)	238
2.2.1.1. K[¹⁸ F]F-K _{2.2.2} preparation	238
2.2.1.2. Fluorine-18 incorporation and pre-purification	239
2.2.1.3. HPLC-purification and formulation	239
2.2.2. Radiosynthesis of [¹⁸ F]CfO-DPA-714 ([¹⁸ F]- 10)	239
2.2.2.1. K[¹⁸ F]F-K _{2.2.2} preparation	239
2.2.2.2. Fluorine-18 incorporation and pre-purification	240
2.2.2.3. HPLC-purification and formulation	240
3. Quality control of the radiotracers	241
3.1. Appearance test	241
3.2. pH test	241
3.3. Identification, chemical and radiochemical purity test	241
3.4. Specific radioactivity determination	241
3.5. On-shelf stability test	242
Chapter 3: <i>In vitro</i> autoradiography and <i>in vivo</i> PET imaging	243
1. Description of the neuroinflammatory animal model used	243
2. <i>In vitro</i> autoradiography	243
3. <i>In vivo</i> μ PET imaging	243
Annexes	245

Publication n°1 : publiée dans la revue « <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> ».....	246
Publication n°2 : publiée dans la revue « <i>J. Label. Compds Radiopharm.</i> »	255
Acte de congrès n°1 : « International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences - 2011 »	256
Acte de congrès n°2 : « International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences - 2013 »	267
Résumé / Abstract	4 ^{ème} de couverture

Liste des figures

Figure 1. Radiographie de la main de l'épouse de Röntgen	27
Figure 2. Vue d'ensemble des différents types de radioactivité.....	29
Figure 3. Structure du Sestamibi	35
Figure 4. Détection de photons en coïncidence après annihilation d'un positon.	36
Figure 5. Images TEP obtenues avec le [¹⁸ F]FDG sur un sujet sain et sur un patient atteint de la maladie d'Alzheimer	37
Figure 6. Structure d'un cyclotron.....	38
Figure 7. Structure du cryptant Kryptofix® K _{2.2.2}	41
Figure 8. Effet d'assistance du tBuOH dans la substitution nucléophile.	44
Figure 9. Structure de la mitochondrie et organisation spatiale du complexe trimérique.	53
Figure 10. Structures des benzodiazépines Diazépam et [¹¹ C]Ro5-4864.....	55
Figure 11. Structure de l'isoquinoléine carboxamide (<i>R</i>)-[¹¹ C]PK11195... ..	56
Figure 12. Structures de radioligands de la TSPO 18 kDa du type phénoxyaryl acétamide.	57
Figure 13. Structure de la [¹¹ C]vinpocétine et de la Vincamine ; pervenche de Madagascar.....	58
Figure 14. Structure de l'aryl-oxodihydropurine [¹¹ C]AC-5216.....	58
Figure 15. Structures des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridines Alpidem, [¹¹ C]CLINME, [¹⁸ F]PBR111 et du bioisostère pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidine	59
Figure 16. Variation de l'affinité des ligands pour la TSPO 18 kDa et les CBR en fonction des substituants en position 5, 7 et en <i>para</i> du noyau phényle	60
Figure 17. Structures de [¹¹ C]DPA-713 et [¹⁸ F]DPA-714, deux radioligands de la protéine TSPO 18 kDa	61
Figure 18. Structures des indole acétamides FGIN-1-27 et [¹¹ C]SSR180575.....	61
Figure 19. Structures des molécules-cibles des deux axes de recherche.....	67
Figure 20. Structures des analogues alcanes et alcynes visés.....	71
Figure 21. Structures générales des alcènes <i>trans</i> et de l'analogue <i>cis</i> C3-ène à synthétiser.....	91
Figure 22. Signaux RMN ¹ H des protons caractéristiques des alcools (<i>E</i>)- 28 et <i>exo</i> - 28	97
Figure 23. Vinylstannanes intermédiaires responsables de la stéréochimie des produits de l'hydrostannylation.....	99
Figure 24. Structure de l'analogue phényle.....	105
Figure 25. Structure générale du précurseur de radiomarquage de [¹⁸ F]DPA-C5yne	112

Figure 26. Structure générale du précurseur de radiomarquage de [¹⁸ F]CfO-DPA-714	114
Figure 27. Précurseurs de marquage envisagés pour [¹⁸ F]F-DPA.....	116
Figure 28. Le TRACERLab FX N Pro.....	123
Figure 29. Cellule blindée.	123
Figure 30. Chromatogrammes obtenus lors de la purification de [¹⁸ F]DPA-C5yne ([¹⁸ F]- 16c)	124
Figure 31. Autoradiographies <i>in vitro</i> obtenues avec [¹⁸ F]DPA-C5yne ([¹⁸ F]- 16c).....	126
Figure 32. Images microPET obtenues <i>in vivo</i> avec [¹⁸ F]DPA-C5yne ([¹⁸ F]- 16c).	127
Figure 33. Autoradiographies <i>in vitro</i> obtenues avec [¹⁸ F]CfO-DPA-714 ([¹⁸ F]- 10).....	128
Figure 34. Images microPET obtenues <i>in vivo</i> avec [¹⁸ F]CfO-DPA-714 ([¹⁸ F]- 10)	128
Figure 35. Structures des analogues amides ciblés.....	129
Figure 36. Produits secondaires supposés lors de la méthylation de l'amide 55	136
Figure 37. Structure des trois analogues retenus pour le radioarquage	143
Figure 38. Scheme of the radiosynthetizer TRACERLab FX N Pro.....	235
Figure 39. Scheme of the radiosynthetizer TRACERLab FX-FN.....	237

Liste des schémas

Schéma 1. Méthode de synthèse de [¹⁸ F]F ₂ à haute RAS	40
Schéma 2. Radiosynthèse du [¹⁸ F]fallypride par S _N 2 sur un précurseur tosylate	43
Schéma 3. Radiosynthèse du [¹⁸ F]FP-CIT par S _N 2 sur un précurseur mésylate.....	43
Schéma 4. Comparaison de deux méthodes de radiosynthèse de la [¹⁸ F]FLT.....	45
Schéma 5. Radiosynthèse du [¹⁸ F]FDG selon la voie électrophile	46
Schéma 6. Radiosynthèse du [¹⁸ F]FDG selon la voie nucléophile	46
Schéma 7. Radiosynthèse du [¹⁸ F]LBT-999 par S _N 2 sur un précurseur chloré	47
Schéma 8. Radiosynthèse du [¹⁸ F]halopéridol par échange fluor-19/fluor-18	48
Schéma 9. Radiosynthèse du [¹⁸ F]flumazénil par échange fluor-19/fluor-18	48
Schéma 10. Mécanisme de la radiosynthèse du [¹⁸ F]flumazénil à partir d'un précurseur nitré	49
Schéma 11. Radiosynthèse bi-étapes du [¹⁸ F]F-A-85380 à partir d'un sel d'ammonium quaternaire .	49
Schéma 12. Substitution nucléophile régiosélective sur des sels d'iodonium ; radiosynthèse du [¹⁸ F]DAA1106	50
Schéma 13. Radiosynthèse de la 6-[¹⁸ F]F-L-DOPA par action directe de [¹⁸ F]F ₂ sur la L-DOPA	52
Schéma 14. Radiosynthèse de la 6-[¹⁸ F]F-L-DOPA par action de [¹⁸ F]F ₂ sur un précurseur stannylé	52
Schéma 15. Clivage oxydatif du cholestérol en prégnégnolone par le cytochrome P450 _{SCC}	54
Schéma 16. Méthode générale de synthèse de DPA-713 développée par Selleri <i>et al</i>	62
Schéma 17. Méthode de synthèse du précurseur de marquage de [¹¹ C]DPA-713	63
Schéma 18. Radiosynthèse de [¹¹ C]DPA-713	63
Schéma 19. Synthèse de DPA-714 et de son précurseur de radiomarquage au fluor-18.....	64

Schéma 20. Radiosynthèse de [¹⁸ F]DPA-714.....	64
Schéma 21. Voie de métabolisation <i>in vivo</i> de [¹⁸ F]DPA-714 par <i>O</i> -déalkylation conduisant au radiométabolite interférant [¹⁸ F]fluoroacétate	66
Schéma 22. Rétrosynthèse des analogues C3yne et C3ane	72
Schéma 23. Synthèses du silyléther 2 et du benzyléther 3	73
Schéma 24. Mécanisme de l'addition nucléophile du carbanion NCCH ₂ ⁻ sur le groupement ester.	73
Schéma 25. Synthèse du 1,3-cétonitrile 4 à partir de l'ester méthylique 3	74
Schéma 26. Mésonérie de l'énolate issu du 1,3-cétonitrile 4	74
Schéma 27. Synthèse du nitrile acétamide 5 par <i>C</i> -alkylation du nitrile 4	75
Schéma 28. Synthèse du pyrazole 6 à partir du nitrile acétamide 5	75
Schéma 29. Mécanisme proposé de formation du pyrazole 6	75
Schéma 30. Synthèse de la pyrazolopyrimidine 7 par cyclisation du pyrazole 6	76
Schéma 31. Obtention de l'alcool 8 par déprotection du benzyléther 7 avec BCl ₃	77
Schéma 32. Mécanisme général de clivage d'un benzyléther par BCl ₃	77
Schéma 33. Essai de déhydroxyfluoruration de l'alcool propargylique 8	78
Schéma 34. Accès à l'analogue C3ane (10) par deux voies différentes.....	79
Schéma 35. Séquence réactionnelle finale employée pour la synthèse de l'analogue C3ane (10).....	80
Schéma 36. Rétrosynthèse des analogues alcanes et alcynes avec l'approche alternative	81
Schéma 37. Schéma de synthèse des analogues alcynes 16b-d et alcanes 18a-c	82
Schéma 38. Rétrosynthèse de l'analogue alcyne C3yne.....	83
Schéma 39. Schéma de synthèse du dérivé fluoropropynyle 19	84
Schéma 40. Schéma de synthèse du 1,3-cétonitrile acétamide 21	84
Schéma 41. Schéma de synthèse de l'analogue C3yne (16a)	85
Schéma 42. Schéma de synthèse final de l'analogue alcyne C3yne (16a)	85
Schéma 43. Rétrosynthèse envisagée pour l'analogue C2ane.....	86
Schéma 44. Essai de synthèse de l'alcool 24a par utilisation du 9-BBNH	87
Schéma 45. Réaction d'hydroboration oxydante réalisée par Wender <i>et al.</i>	88
Schéma 46. Essai de synthèse de l'alcool 24a par utilisation du complexe BH ₃ .THF.....	88
Schéma 47. Essais de séparation des alcools 24a et 24b par différentes stratégies de dérivatisation. .	89
Schéma 48. Essai d'époxydation du vinyl-DPA (23).	90
Schéma 49. Analyse rétrosynthétique des analogues alcènes selon les axes A, B et C.....	91
Schéma 50. Rétrosynthèse de l'analogue (<i>E</i>)-C3ène selon les deux stratégies de l'axe A.....	92
Schéma 51. Essai de synthèse du sel de phosphonium.....	92
Schéma 52. Mécanisme de l'éthérification de Williamson intramoléculaire	93
Schéma 53. Essai d'alkylation directe de la triphénylphosphine	93
Schéma 54. Synthèse de l'acide 26 par condensation de Knoevenagel.....	93
Schéma 55. Synthèse du synthon-clé 27 par réduction chimiosélective de l'acide 26	94
Schéma 56. Rétrosynthèses envisagées pour les analogues alcènes selon l'axe de recherche B.....	95
Schéma 57. Réaction générale d'une métathèse intermoléculaire des oléfines	96
Schéma 58. Essai de synthèse de l'alcool C5énol par métathèse d'oléfines	96
Schéma 59. Hydrostannylation de I-DPA (14).....	97

Schéma 60. Cycle catalytique de la réaction d'hydrostannylation	98
Schéma 61. Mécanismes suggérés pour la formation des vinylstannanes <i>trans</i> et <i>exo</i>	99
Schéma 62. Essai de dérivatisation du mélange d'alcools isomères (<i>E</i>)- 28 et <i>exo</i> - 28	100
Schéma 63. Essai de préparation du stannane (<i>E</i>)- 30 par hydrostannylation radicalaire	101
Schéma 64. Essai de couplage de Stille avec le stannane (<i>E</i>)- 30	101
Schéma 65. Essai de synthèse de l'alcène 31 à partir de DPA-713.....	102
Schéma 66. Essai de couplage de Suzuki de I-DPA (14) avec un pinacolborane commercial	102
Schéma 67. Essai de couplage de Suzuki de DPA-OTf (33) avec un pinacolborane commercial	103
Schéma 68. Rétrosynthèse envisagée pour accéder à l'analogue (<i>Z</i>)-C3ène.....	103
Schéma 69. Essai de synthèse de l'alcène 34 par hydrogénation partielle du benzyléther 7	104
Schéma 70. Rétrosynthèse de l'analogue phényle.....	105
Schéma 71. Schéma de synthèse de l'analogue phényle (38).....	106
Schéma 72. Principales voies de métabolisation de CfO-DPA-714 (10) observées <i>in vitro</i> par incubation microsomiale au bout de 30 min	110
Schéma 73. Voie d'obtention du précurseur de radiomarquage de [¹⁸ F]DPA-C5yne	112
Schéma 74. Essai de tosylation de 15c conduisant en partie à la formation de l'analogue chloré	113
Schéma 75. Schéma de synthèse du précurseur de radiomarquage de [¹⁸ F]DPA-C5yne 39	113
Schéma 76. Voie d'obtention du précurseur de radiomarquage de [¹⁸ F]CfO-DPA-714	114
Schéma 77. Schéma de synthèse du précurseur de radiomarquage de [¹⁸ F]CfO-DPA-714 (40).....	115
Schéma 78. Synthèse du précurseur nitro 41 à partir du triflate 33 par couplage au palladium.....	117
Schéma 79. Synthèse du précurseur stannylé 42 par couplage de Stille avec l'hexabutyldiétain	118
Schéma 80. Essai de synthèse du précurseur iodonium à partir du dérivé stannylé 42	118
Schéma 81. Essai de synthèse du précurseur iodonium à partir de I-DPA (14)	119
Schéma 82. Rétrosynthèse du précurseur de marquage ammonium quaternaire.....	120
Schéma 83. Essai de couplage de I-DPA avec un aminostannane commercial.....	121
Schéma 84. Rétrosynthèse du sel d'ammonium quaternaire	121
Schéma 85. Schéma de synthèse du sel d'ammonium quaternaire 46	122
Schéma 86. Radiosynthèse de [¹⁸ F]DPA-C5yne ([¹⁸ F]- 16c)	123
Schéma 87. Radiosynthèse de [¹⁸ F]CfO-DPA-714 ([¹⁸ F]- 10)	125
Schéma 88. Rétrosynthèse des analogues amides	130
Schéma 89. Schéma de synthèse des analogues amides 55 à 64	131
Schéma 90. Influence des substituants en <i>ortho</i> et <i>para</i> sur la substitution <i>ipso</i> intramoléculaire.....	132
Schéma 91. Mécanisme proposé pour la substitution <i>ipso</i> intramoléculaire	133
Schéma 92. Formation d'amides par action du triméthylaluminium sur des esters	135
Schéma 93. Essai de méthylation de l'analogue cyclopropylamine 55 par l'iodométhane.....	136
Schéma 94. Schéma de synthèse du chlorhydrate de <i>N</i> -méthylcyclopropylamine 67	136
Schéma 95. Rétrosynthèse des précurseurs de marquage amides.....	138
Schéma 96. Schéma réactionnel de synthèse des précurseurs amides.....	139

Liste des tableaux

Tableau 1. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs α employés en médecine nucléaire	30
Tableau 2. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs β^- employés en médecine nucléaire.....	31
Tableau 3. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs β^+ employés en médecine nucléaire	31
Tableau 4. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs γ employés en médecine nucléaire	32
Tableau 5. Comparaison de la vitesse de solvolysé de différents 1-phényléthylsulfonates et halogénures dans EtOH-H ₂ O 80/20 à 75 °C	42
Tableau 6. Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de DPA-714 et des analogues alcynes 16a-d	107
Tableau 7. Analyses LC-MS et MS-MS des métabolites des analogues alcynes 16a-d	108
Tableau 8. Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de DPA-714 et des analogues alcanes 10 et 18b-d	109
Tableau 9. Détermination des métabolites de CfO-DPA-714 par LC-MS et MS-MS	110
Tableau 10. Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de l'analogue phényle (38).....	111
Tableau 11. Criblage des conditions optimales pour le couplage de Buchwald-Hartwig.....	120

Avant-propos

A propos de la thèse et de son sujet.

Cette thèse a été réalisée au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), localisé à Orsay, du 11 Octobre 2011 au 10 Avril 2014. Le SHFJ fait partie de l'Institut d'imagerie biomédicale (I²BM) qui est lui-même rattaché à la Direction des sciences du vivant (DSV) du CEA. Il s'agit d'un centre d'imagerie moléculaire dédié à la recherche préclinique et clinique principalement dans les domaines de l'oncologie et de la neurologie.

Dans son principe, l'imagerie moléculaire vise à observer le fonctionnement des organes et à mettre en évidence des processus moléculaires pour, par exemple, établir un diagnostic ou effectuer un suivi thérapeutique. Actuellement, les techniques les plus représentatives sont l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la Tomographie par Emission de Positons (TEP). La TEP présente un intérêt particulier pour l'étude des pathologies du système nerveux central, telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, où des techniques de diagnostic atraumatiques sont requises. Dans ce contexte, la protéine de translocation 18 kDa (ou TSPO) représente une cible pharmacologique particulièrement intéressante en TEP. En effet, la surexpression de cette protéine est étroitement liée à l'inflammation du système nerveux central et *de facto*, elle constitue un biomarqueur potentiel pour le diagnostic de ces pathologies. Ce travail de thèse s'intéresse au développement de nouvelles sondes moléculaires de la TSPO 18 kDa, c'est-à-dire des ligands exogènes marqués avec un radioémetteur de positons et capables de se fixer spécifiquement sur cette protéine pour en permettre l'imagerie.

A propos du manuscrit.

Ce manuscrit se compose de quatre parties indépendantes. La première partie introduit des notions scientifiques utiles à la compréhension du travail de thèse et se rapportant à la radioactivité, à l'imagerie TEP, à la radiochimie du fluor-18 ainsi qu'à la cible biologique visée (TSPO 18 kDa). Dans la deuxième partie sont détaillés les résultats du projet de recherche avec la description et la discussion des synthèses organiques des ligands, leur évaluation biologique *in vitro*, le radiomarquage au fluor-18, les autoradiographies *in vitro* et les images TEP *in vivo* des deux meilleurs d'entre eux. La troisième partie conclut le projet de thèse dans son ensemble et indique les perspectives de recherche envisagées. Enfin, la quatrième partie décrit les protocoles expérimentaux de synthèse organique, de radiochimie, d'autoradiographie *in vitro* et d'imagerie TEP *in vivo* qui ont été mis en oeuvre pour mener à bien le projet. Les première, deuxième et troisième parties de ce manuscrit ont été rédigées en français et la quatrième partie, correspondant à la partie expérimentale, a volontairement été rédigée en anglais pour pouvoir l'inclure dans les publications.

A propos de la caractérisation des produits synthétisés.

Chaque nouveau composé a été systématiquement caractérisé avec son rapport frontal (R_f) et son spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H). Le spectre de résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN ^{13}C) a également été décrit sauf dans le cas où il s'agissait d'un mélange complexe. Des analyses complémentaires telles que la spectroscopie de masse à basse (MS) ou haute résolution (HRMS) ont aussi été effectuées pour certains produits finaux et intermédiaires avancés.

A propos des publications et communications.

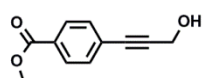
Les travaux relatifs à la synthèse organique et à la radiochimie ont permis la publication d'un article dans « Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters ». Un autre article a été accepté dans le « Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals » et un troisième est en cours d'écriture et devrait être soumis prochainement (références ci-après). Les recherches ont également donné lieu à deux actes de congrès de la spécialité (références ci-après).

V. Médran-Navarrete, A. Damont, M.-A. Peyronneau, B. Kuhnast, N. Bernards, G. Pottier, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard, F. Dollé. Preparation and evaluation of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamides, closely related to DPA-714, as potent ligands for imaging the TSPO 18 kDa with PET. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 1550-1556.

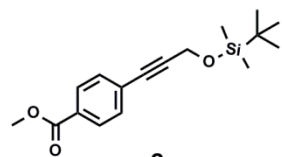
V. Médran-Navarrete, N. Bernards, B. Kuhnast, A. Damont, G. Pottier, M. Kassiou, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard, F. Dollé. [^{18}F]DPA-C5yne, a novel fluorine-18-labeled analogue of DPA-714 : Radiosynthesis and preliminary evaluation as a radiotracer for imaging neuroinflammation with PET. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, 57, 410-418.

A. Damont, A.S.C. Ching, **V. Médran-Navarrete**, B. Kuhnast, H. Gaudy, F. Dollé. Synthesis and fluorine-18 labelling of a novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamide, CfO-DPA-714, a compound devoid of the metabolically unstable fluoroalkoxy moiety. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2011**, 54, S461. XIXth International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS), Amsterdam, Pays-Bas, 2011.

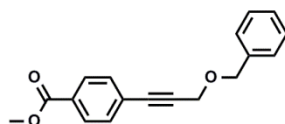
V. Médran-Navarrete, A. Damont, B. Kuhnast, M. Kassiou, R. Boisgard, F. Dollé. Synthesis of novel fluorine-18-labelled analogue of DPA-714, [^{18}F]DPA-C5yne, for imaging neuroinflammation with PET. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2013**, 56, S294. XXth International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS), Jeju, Corée du Sud, 2013.



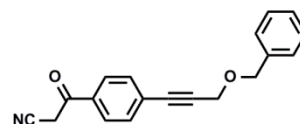
1



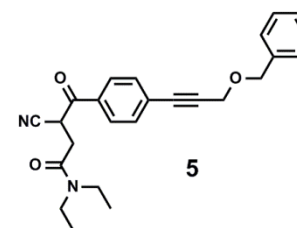
2



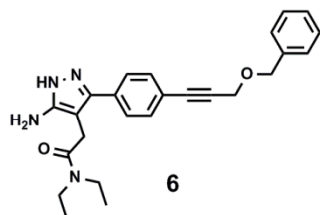
3



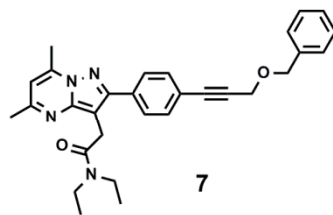
4



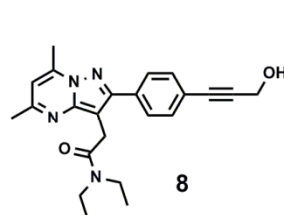
5



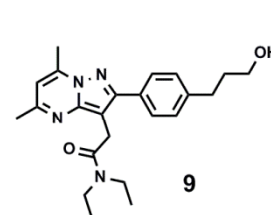
6



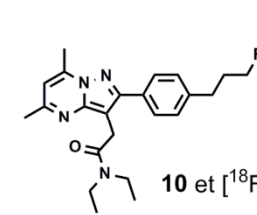
7



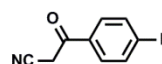
8



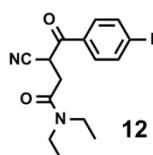
9



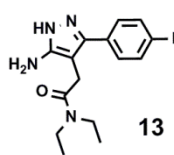
10 et [¹⁸F]-10



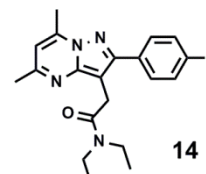
11



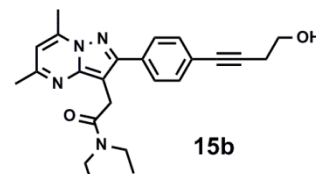
12



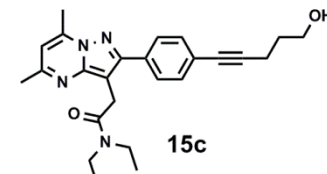
13



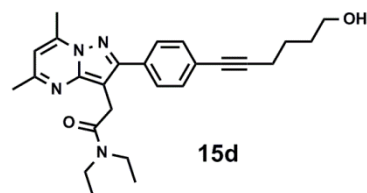
14



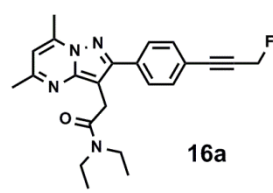
15b



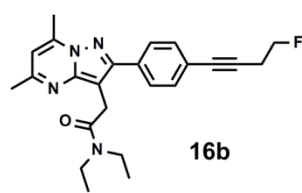
15c



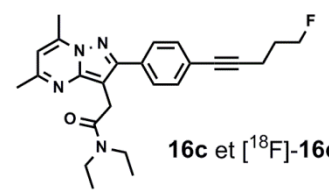
15d



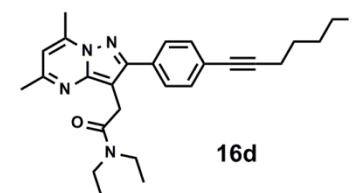
16a



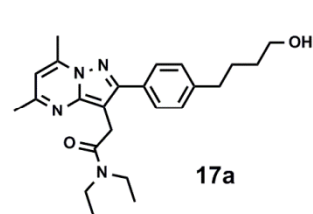
16b



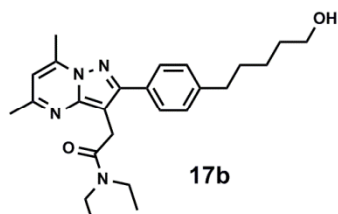
16c et [¹⁸F]-16c



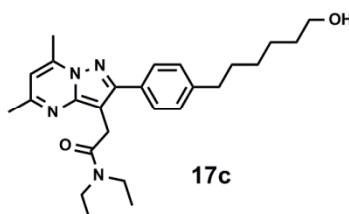
16d



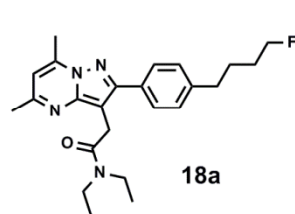
17a



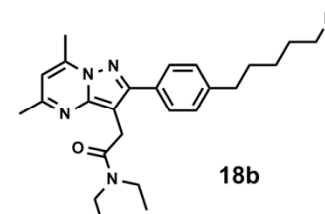
17b



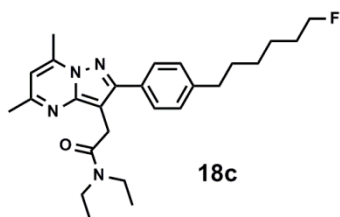
17c



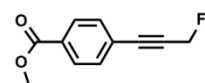
18a



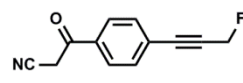
18b



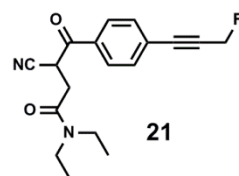
18c



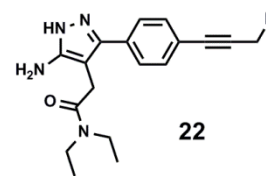
19



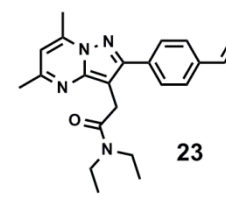
20



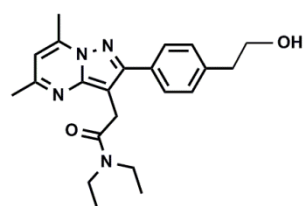
21



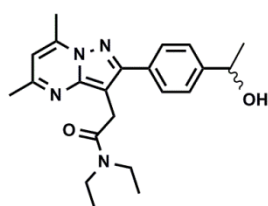
22



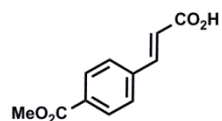
23



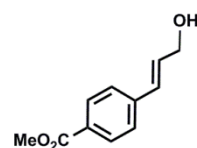
24a



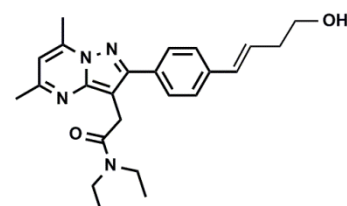
24b



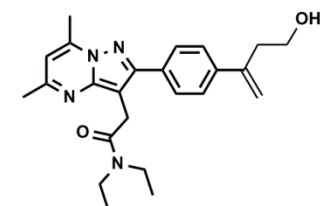
26



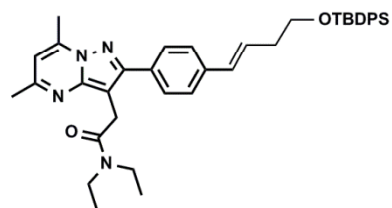
27



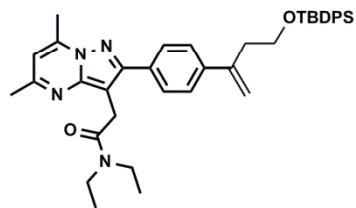
(E)-28



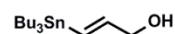
exo-28



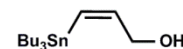
(E)-29



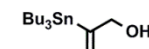
exo-29



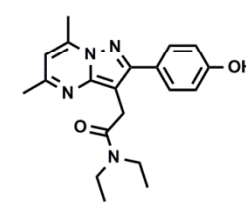
(E)-30



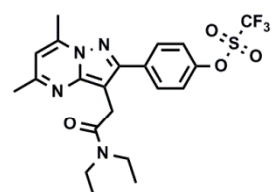
(Z)-30



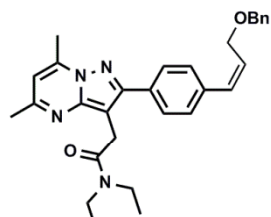
exo-30



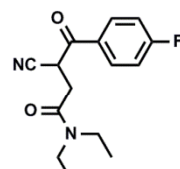
32



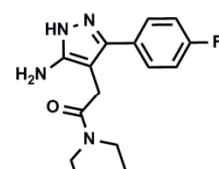
33



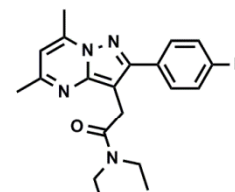
34



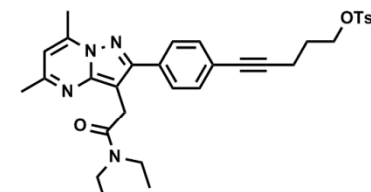
36



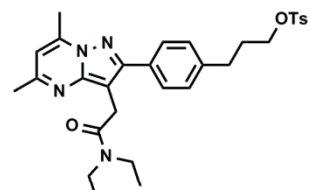
37



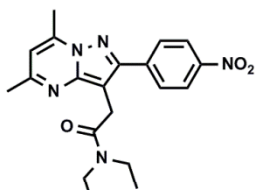
38



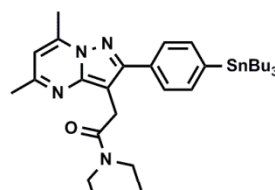
39



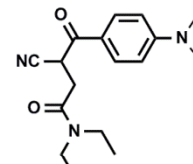
40



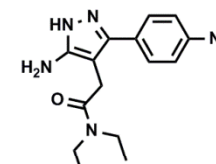
41



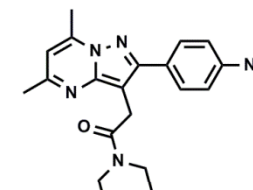
42



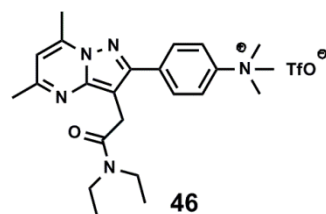
43



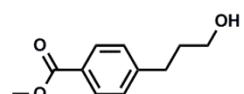
44



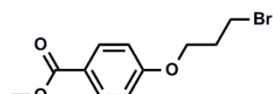
45



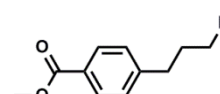
46



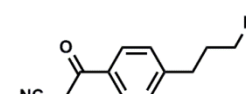
47



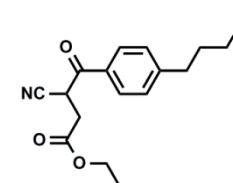
48



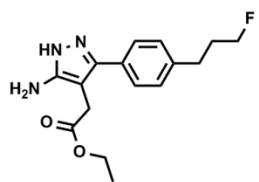
49



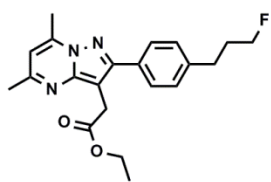
50



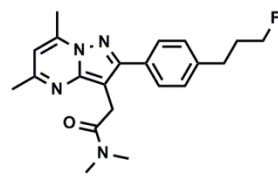
52



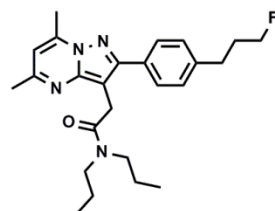
53



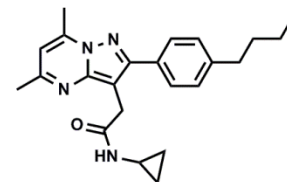
54



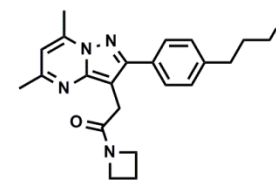
55



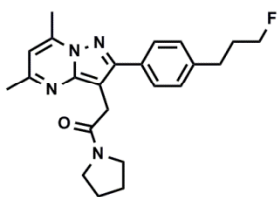
56



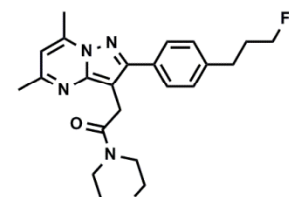
57



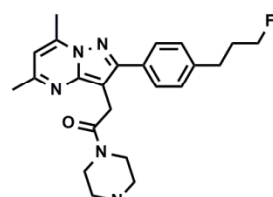
58



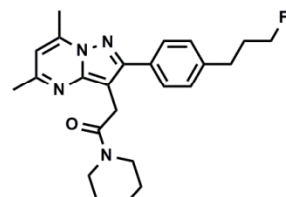
59



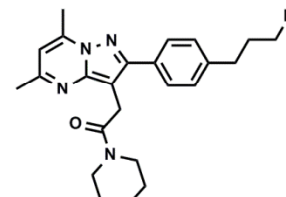
60



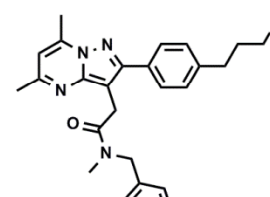
61



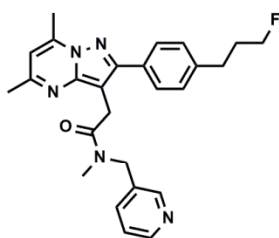
61.HCl



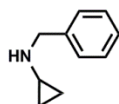
62



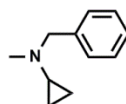
63



64



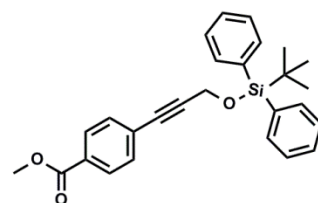
65



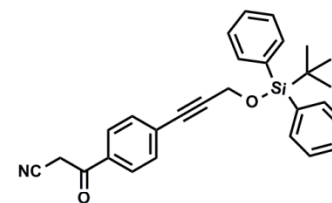
66



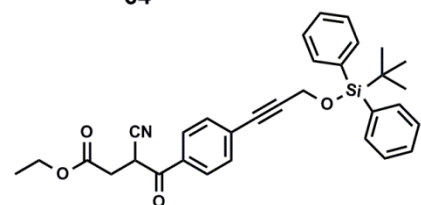
67



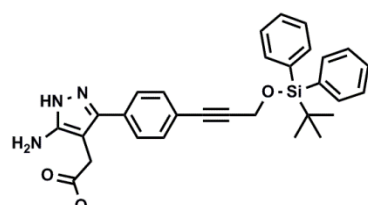
68



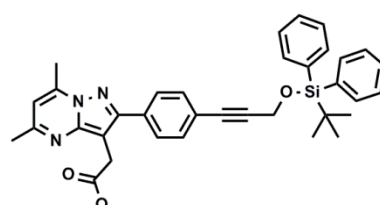
69



70



71



72

NOTE IMPORTANTE

Sont représentées uniquement les structures des composés ayant été synthétisés, isolés et caractérisés.

Première partie

Introduction et généralités

Chapitre 1: Notions de radioactivité

1. Découverte de la radioactivité

La radioactivité a été découverte fortuitement en 1895 par Henri Becquerel alors qu'il manipulait du sulfate de potassium uranique. Il s'aperçut que cette substance était capable de noircir une plaque photographique dans l'obscurité. De même, il observa que certains objets placés entre le sel d'uranium et la plaque photographique diminuaient l'intensité du noircissement. Après diverses expériences, il supposa que le composé émettait un rayonnement particulier qu'il baptisa « rayon uranique ». La même année, Wilhelm Conrad Röntgen inventa un dispositif expérimental constitué d'un tube de verre rempli d'un gaz à basse pression et muni de deux électrodes. En bombardant la cathode par un faisceau d'électrons, Röntgen observa la fluorescence d'un écran recouvert de platinocyanure de baryum. Cette fluorescence était observée lorsque l'écran était disposé à une distance inférieure à deux mètres du tube et ce, même lorsqu'un carton noir était intercalé entre le tube et l'écran. Röntgen en conclut qu'un rayonnement inconnu, qu'il nomma « rayon X », était produit par le tube et était la cause de cette fluorescence. Bien que les rayons X présentassent des propriétés analogues aux rayonnements découverts par Becquerel, la communauté scientifique mis un certain temps à faire le rapprochement. En revanche, Röntgen pris rapidement conscience des applications potentielles de sa découverte. Ainsi, le soir du 22 décembre 1896, il demanda à sa femme d'interposer sa main entre l'écran et le tube et réalisa la toute première radiographie X de l'histoire qui nous soit parvenue (**Figure 1**).

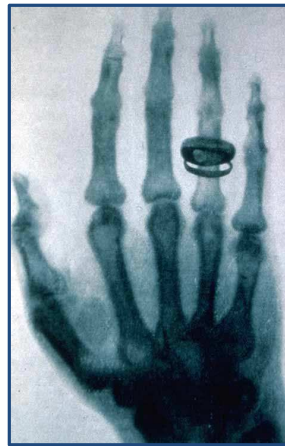


Figure 1. Radiographie de la main de l'épouse de Röntgen.

Suite à ces découvertes, plusieurs scientifiques décidèrent d'étudier ces rayonnements de plus près. En 1898, Pierre Curie et son épouse Marie Skłodowska Curie parvinrent à isoler le polonium-210 et le radium-226. Ils entreprirent également de mesurer leur activité grâce à l'ionisation de l'air engendrée par ces éléments radioactifs. C'est aussi à cette époque que Marie Curie introduisit pour la première fois le terme de radioactivité. Dès lors, de nombreuses expériences furent entreprises pour découvrir les lois physiques régissant ce phénomène. L'une des avancées les plus décisives fut franchie en 1899 par Ernest Rutherford qui, en mesurant

l'absorption de la radioactivité par une feuille d'aluminium, mis en évidence deux types de rayonnements: le premier, dit α , était arrêté par quelques microns d'épaisseur de matériau alors que le second, le rayonnement β , nécessitait plusieurs centimètres pour être stoppé. Par la suite, Rutherford identifia le rayonnement α comme étant constitué de noyaux d'hélium et le rayonnement β d'électrons. En 1900, Paul Villard découvrit le rayonnement γ dans l'émission du radium. De 1901 à 1903, Rutherford, en collaboration avec Frédéric Soddy, démontra que la radioactivité résultait de la transmutation d'un élément en un autre. En 1913, Niels Bohr avança que le noyau atomique était le siège de la radioactivité alors que le cortège électronique était responsable des propriétés chimiques des éléments. En 1919, Rutherford réalisa la première réaction nucléaire en bombardant de l'azote avec des particules α (**Equation 1**).



En 1931, Ernest Lawrence et Milton Stanley Livingston construisirent à Berkeley le premier accélérateur de particule circulaire: le cyclotron. Un an plus tard, le neutron fut découvert par James Chadwick en bombardant du béryllium avec des particules α (**Equation 2**).



En 1934, Frédéric Joliot et sa femme Irène découvrirent la radioactivité artificielle et ouvrirent le champ à la médecine nucléaire en rendant possible la production de radio-isotopes adaptés à une utilisation médicale.

2. Les différents modes de désintégration nucléaire

2.1. Rappel sur la structure de l'atome

Par convention, chaque élément chimique est représenté par le symbole ${}^A_Z\text{X}$ avec:

X: symbole de l'élément chimique

A: nombre de masse (nombre de protons et de neutrons)

Z: numéro atomique (nombre de protons)

Le **nucléide** est défini par son numéro atomique Z et son nombre de masse A . Deux nucléides sont dits **isotopes** lorsque les noyaux comportent le même nombre de protons (même numéro atomique) mais un nombre de neutrons différent. C'est le cas de l'élément hydrogène qui possède trois isotopes: l'hydrogène ${}^1_1\text{H}$ (zéro neutron), le deutérium D ou ${}^2_1\text{H}$ (un neutron) et le tritium T ou ${}^3_1\text{H}$ (deux neutrons). Certains nucléides sont radioactifs comme c'est le cas pour le tritium. On parle alors de **radionucléides** ou de **radio-isotopes**. Comme nous allons l'expliquer

ci-après, un radionucléide peut se stabiliser en évacuant de l'énergie sous forme de rayonnements ionisants de différents types (**Figure 2**).

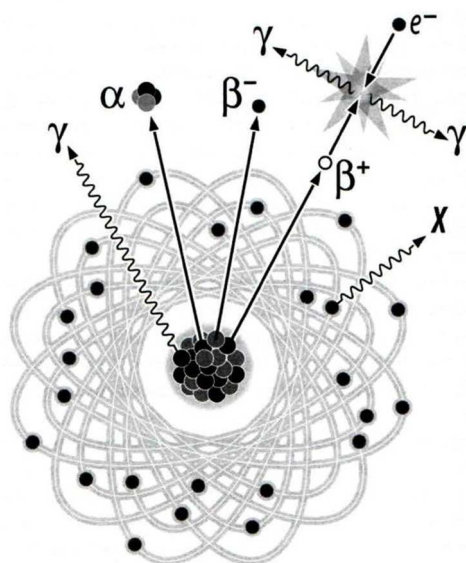


Figure 2. Vue d'ensemble des différents types de radioactivité.¹

Illustration reproduite avec l'autorisation de l'auteur.

2.2. Rayonnement α

Ce mode de désintégration met en jeu la libération d'une particule α qui est un noyau d'hélium ${}^4_2\text{He}$ (**Equation 3** et **Equation 4**).



Du fait de sa masse importante (7000 fois celle de l'électron), la particule α ne peut parcourir que quelques centimètres dans l'air avant d'être absorbée par la matière. Une simple feuille de papier suffit à l'arrêter et de ce fait, elle ne présente pas de réel danger pour la santé en exposition externe. En revanche, si la source du rayonnement est inhalée ou ingérée (exposition interne), la radioactivité α peut s'avérer très dangereuse car s'agissant d'une radiation très énergétique (4-10 MeV), elle peut causer d'importants dégâts cellulaires, en particulier au niveau de l'ADN. D'ailleurs, le polonium-210, qui est un émetteur de particules α présent dans le tabac, serait impliqué dans le cancer du poumon. Actuellement, plus de 100 autres émetteurs α ont été identifiés. La moitié de ces isotopes sont des émetteurs « lourds », c'est-à-dire de numéro atomique supérieur à celui du plomb ($Z > 82$), comme l'uranium, le radium, le thorium, l'actinium et le neptunium (**Tableau 1**). Néanmoins, ces radioisotopes sont employés en médecine nucléaire pour des applications thérapeutiques par radiothérapie interne vectorisée.

¹ R. Zimmermann, *La Médecine Nucléaire*, Ed. EDP Sciences, 2006.

Un radiopharmaceutique marqué au radium-223 et utilisé pour le traitement du cancer de la prostate a récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché sous le nom de Xofigo (Bayer).

Par exemple, le noyau radioactif du radium-226 se désintègre selon un processus α pour former du radon-222 (**Equation 4**).



Radionucléide	Période	E_{max} (MeV)	Emission
Bismuth-213	45,6 minutes	5,87	α, β^-
Bismuth-212	60,6 minutes	6,05	α, β^-
Astate-211	7,2 heures	5,87	α
Radium-224	3,6 jours	5,68	α
Actinium-225	10 jours	5,73	α
Radium-223	11 jours	5,78	α

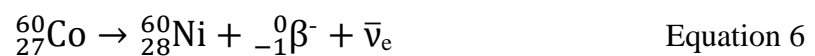
Tableau 1. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs α employés en médecine nucléaire.¹

2.3. Rayonnement β

Il existe deux types de rayonnement β . Un radioélément dont le noyau est excédentaire en neutrons par rapport aux configurations stables est un émetteur β^- . Un neutron se transforme en proton en expulsant hors du noyau un électron ou particule β^- et un anti-neutrino $\bar{\nu}_e$ (**Equation 5**). Les principaux émetteurs β^- employés en médecine nucléaire sont résumés dans le **Tableau 2**. De manière générale, ces radioisotopes sont plutôt employés en médecine nucléaire pour des applications thérapeutiques. Dans le cas où un rayonnement γ accompagne la réaction de désintégration, certains de ces radioisotopes sont aussi utilisés en imagerie.



Par exemple, le noyau radioactif de cobalt-60 se désintègre selon un processus β^- pour former du nickel-60 (**Equation 6**).



Radionucléide	Période	E _{max} (MeV)	Emission
Rhénium-188	16,9 heures	2,12	β^- , γ
Holmium-166	26,8 heures	1,85	β^+
Samarium-153	46,3 heures	0,70	β^- , γ
Cuivre-67	61,9 heures	0,39	β^- , γ
Yttrium-90	64,1 heures	2,28	β^-
Rhénium-186	3,8 jours	1,08	β^- , X, γ
Lutécium-177	6,7 jours	0,50	β^- , γ
Iode-131	8,0 jours	0,61	β^- , CE*, γ
Erbium-169	9,4 jours	0,35	β^-
Phosphore-32	14 jours	1,71	β^-
Strontium-89	50 jours	1,49	β^-

*CE : capture électronique

Tableau 2. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs β^- employés en médecine nucléaire¹.

De même, un radioélément dont le noyau est excédentaire en protons par rapport aux configurations stables est un émetteur β^+ (**Tableau 3**). Dans ce cas, un proton se transforme en neutron en expulsant hors du noyau un positon (électron positif) ou particule β^+ et un neutrino ν_e (**Equation 7** et **Equation 8**).



Par exemple, le noyau radioactif de fluor-18 se désintègre selon un processus β^+ pour former de l'oxygène-18 (**Equation 8**).



Radionucléide	Période	E _{max} (MeV)	Emission
Rubidium-82m	1,30 minute	3,35	β^+ , CE
Oxygène-15	2,04 minutes	1,73	β^+
Azote-13	9,96 minutes	1,20	β^+
Carbone-11	20,4 minutes	0,96	β^+
Technétium-94m	53,0 minutes	2,47	β^+ , γ
Gallium-68	1,13 heure	1,89	β^+ , γ
Fluor-18	109,8 minutes	0,63	β^+
Cuivre-64	12,7 heures	1,35	β^+ , β^- , CE
Yttrium-86	14,7 heures	1,25	β^+
Iode-124	4,2 jours	2,13	β^+ , CE, γ

Tableau 3. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs β^+ employés en médecine nucléaire.¹

Le rayonnement β est constitué de particules légères se déplaçant à très grande vitesse, c'est pourquoi il est plus pénétrant que le rayonnement α . En fonction de l'énergie des particules, il nécessite un écran de plexiglas plus ou moins épais pour être stoppé. Les particules β^- sont assez rapidement absorbées par la matière où elles engendrent des rayons X. En ce qui concerne les particules β^+ , celles-ci sont rapidement annihilées par des électrons environnants en générant deux photons γ de 511 keV émis de manière anti-parallèle. La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est basée sur la détection de ces deux photons dits en coïncidence (**Chapitre 2, section 2**).

2.4. Rayonnement γ

Contrairement aux rayonnements α et β qui sont constitués de particules, le rayonnement γ est une onde électromagnétique de courte longueur d'onde et d'énergie variant de quelques keV à plusieurs MeV. Il est très pénétrant et peut parcourir plusieurs centaines de mètres dans l'air. Pour atténuer ce rayonnement, il est nécessaire d'utiliser de fortes épaisseurs de matériaux (des dizaines de centimètres de béton ou quelques centimètres de plomb). Les émetteurs γ couramment utilisés en médecine nucléaire sont résumés dans le **Tableau 4**. De manière générale, ces radioisotopes sont employés en médecine nucléaire à des fins diagnostiques (imagerie médicale).

Radionucléide	Période	E_{\max} (keV)	Emission
Technétium-99m	6,02 heures	140	γ
Iode-123	13,2 heures	160	CE, γ
Indium-111	67,3 heures	250	γ , CE
Thallium-201	3,0 jours	170	X, γ
Gallium-67	3,3 jours	190	CE, γ
Xénon-133	5,2 jours	81	β^- , γ
Chrome-51	23 jours	320	X, γ
Xénon-127	36 jours	200	X, γ

Tableau 4. Propriétés de quelques radioisotopes émetteurs γ employés en médecine nucléaire.¹

2.5. Rayons X

Les rayons X sont produits dans une enceinte de verre où règne un vide poussé. Des électrons sont émis par un filament dans lequel circule un courant électrique. Ceux-ci sont ensuite accélérés par un champ électrique créé par une différence de potentiel élevée (généralement de 10 à 150 kV) entre le filament qui sert de cathode et l'anode. Ces électrons entrent en collision avec la cible (anode) constituée de métal. Des rayons X peuvent alors être produits selon deux mécanismes distincts. Du fait de leur vitesse très élevée, les électrons possèdent une énergie cinétique suffisante pour perturber les couches électroniques internes des atomes de la cible.

Ces atomes, dans un état excité, vont alors émettre des rayons X en retournant à leur état fondamental. Il s'agit là du premier cas de figure. Dans le deuxième cas, le ralentissement des électrons dans la matière produit un rayonnement de freinage qui peut également donner lieu à la production de rayons X.

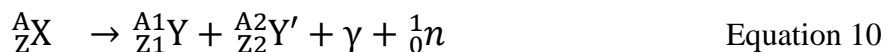
Il existe un cas particulier appelé **capture électronique** (CE) qui concerne les radioéléments constitués d'un excès de protons par rapport aux neutrons. Leurs noyaux peuvent se stabiliser par la capture d'un électron de la couche électronique la plus interne. Le proton excédentaire va alors se transformer en neutron en libérant un neutrino ν_e . Le vide laissé dans la première orbitale va être comblé en prélevant un électron de l'orbitale supérieure ce qui va se traduire par l'émission d'un photon X γ dont l'énergie correspond à la transition énergétique effectuée (**Equation 9**).



Si l'énergie est transférée à une orbitale électronique externe plutôt que d'être produite sous la forme d'un rayonnement X, des électrons peuvent être éjectés hors du cortège électronique. On parle alors d'**électrons Auger**. Ils sont moins énergétiques que les particules β mais présentent des applications thérapeutiques analogues aux particules α du fait de leur interaction très localisée avec la matière (quelques dixièmes de millimètres). Parmi les radioémetteurs Auger disponibles, on peut notamment citer le gallium-67 ($t_{1/2} = 3,2$ jours).

2.6. Fission spontanée

Ce mode de désexcitation se produit avec des noyaux lourds qui se scindent en deux noyaux plus légers en libérant un photon γ et un neutron (**Equation 10**). Le principe de la fission est notamment utilisé pour produire de l'énergie dans les centrales nucléaires ainsi que pour l'armement militaire.



3. Grandeurs et unités

3.1. Activité

L'activité d'une source radioactive, notée A, désigne le nombre de désintégrations nucléaires par unité de temps. Dans le système international, elle s'exprime en Becquerel (Bq), lequel équivaut à une désintégration (ou coup) par seconde ($1 \text{ Bq} = 1 \text{ cp.s}^{-1}$). L'unité historique est le Curie (Ci), encore utilisé aujourd'hui, qui est définie comme le nombre de désintégrations d'un gramme de radium. Ce nombre étant égal à 37 milliards, un curie équivaut à $3,7 \times 10^{10}$ Bq soit 37 GBq. L'activité A(t) d'un radioélément à l'instant t est donnée par la loi de décroissance radioactive qui est une fonction exponentielle décroissante (**Equation 11**).

$$A(t) = A_0 e^{-\lambda t} \quad \text{Equation 11}$$

$A(t)$: activité à l'instant t en Bq ou Ci

A_0 : activité initiale en Bq ou Ci

λ : constante radioactive en s^{-1}

t : temps en seconde

3.2. Période radioactive

La période radioactive (ou demi-vie), notée $t_{1/2}$, est définie comme le temps au bout duquel l'activité d'un élément radioactif est divisée par deux. Il s'agit d'une grandeur intrinsèque pouvant s'étaler de quelques picosecondes à plusieurs milliards d'années. La loi de décroissance radioactive de l'**Equation 11** peut s'exprimer de façon à faire apparaître la période en remplaçant la constante radioactive λ par $\ln(2)/t_{1/2}$ (**Equation 12**).

$$A(t) = A_0 e^{-\frac{\ln 2}{t_{1/2}} t} \quad \text{Equation 12}$$

$t_{1/2}$: période exprimée en seconde

Cette équation met en évidence que l'activité d'une source est réduite au dixième de sa valeur initiale après 3,3 périodes ($2^{3,3} \approx 10$) et au millième après 10 périodes ($2^{10} = 1024$). La période est une grandeur utile pour, par exemple, prédire l'activité de radioéléments en fonction du temps ou comparer leurs décroissances respectives. Ainsi, l'activité du carbone-11 ($t_{1/2} = 20,4$ minutes) est divisée par 10 après environ 1 heure alors que celle du fluor-18 ($t_{1/2} = 109,8$ minutes) l'est au bout de 6 heures.

3.3. Radioactivité spécifique

La radioactivité spécifique (RAS) d'un radioélément correspond à son activité rapportée à la quantité de matière présente. Elle s'exprime en becquerels (Bq) ou en curies (Ci) par mole. Il est possible de calculer la RAS théorique d'un radioélément uniquement à partir de sa période (**Equation 13**).

$$\text{RAS}_{\max} (\text{Bq/mol}) = \frac{\ln 2 \times N_A}{t_{1/2}} \quad \text{Equation 13}$$

N_A : nombre d'Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

$t_{1/2}$: période exprimée en seconde

Par exemple, la RAS théorique du fluor-18 est de $6,33 \cdot 10^4 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$.

Chapitre 2: La médecine nucléaire et la Tomographie par Emission de Positons

1. La médecine nucléaire

La médecine nucléaire est une spécialité médicale regroupant l'ensemble des techniques utilisant les radioéléments chez l'être humain, que ce soit à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Dans les deux cas, une substance contenant un isotope radioactif, le **radiopharmaceutique**, est administrée au patient puis se fixe sélectivement sur un tissu biologique ou un organe, la **cible**. Les rayonnements émis par les radioéléments peuvent être soit absorbés à très courte distance, pour par exemple détruire des cellules tumorales (thérapie vectorisée ou métabolique), soit captés à l'extérieur du corps humain par un dispositif de détection afin de localiser le radiopharmaceutique dans l'organisme et visualiser sa biodistribution (imagerie). Dans le cas de l'imagerie TEMP (Tomographie par Emission Mono-Photonique), une technique d'imagerie scintigraphique, on retrouve par exemple le Sestamibi (Cardiolite®) qui est un complexe hexavalent de technétium-99m principalement utilisé pour l'imagerie du myocarde (**Figure 3**).

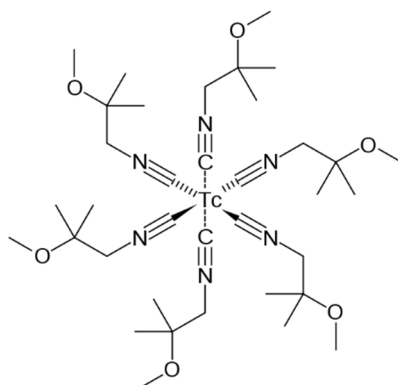


Figure 3. Structure du Sestamibi.

Les principaux avantages de l'imagerie nucléaire sont de fournir une imagerie fonctionnelle, c'est-à-dire relative au fonctionnement de l'organe étudié. De plus, il s'agit d'une méthode non invasive puisque, sauf cas particulier, le produit radioactif est administré par une simple injection intraveineuse. Actuellement, la quasi-totalité des spécialités médicales font appel aux radioisotopes, que ce soit en vue d'un diagnostic ou pour un traitement thérapeutique, notamment dans les domaines de l'oncologie et de la neurologie. A titre d'exemple, depuis plus de cinquante ans, le cancer de la thyroïde est traité dans 90 % des cas par l'iode-131 qui apporte une guérison totale et définitive.^{1,2}

² M. Stegen, E. Laurent, M. Rubinstein. *Médecine nucléaire. Manuel pratique*, Ed. De Boeck, 2000.

2. La Tomographie par Emission de Positons

2.1. Champs d'application

Parmi les techniques d'imagerie nucléaire existantes, la Tomographie par Emission de Positons (TEP) permet de suivre *in vivo* le devenir d'un radiopharmaceutique préalablement marqué avec un émetteur de positons. La TEP est une technique d'imagerie fonctionnelle et permet par exemple d'étudier le fonctionnement d'un organe (cœur, cerveau, foie...), de diagnostiquer certaines tumeurs malignes, d'évaluer l'efficacité de protocoles thérapeutiques ou de mesurer des paramètres physiologiques tels que le pH intracellulaire, le débit sanguin et la consommation tissulaire en oxygène. Par ailleurs, elle présente l'avantage de fournir des informations aussi bien qualitatives que quantitatives. Il est ainsi possible de visualiser et de quantifier la distribution d'un radiotraceur dans les différents organes.

2.2. Principe physique

Comme son nom l'indique, l'imagerie TEP fait intervenir des émetteurs de positons β^+ (électrons positifs) (**Equation 7**). Une fois le positon émis, celui-ci va parcourir une distance de quelques millimètres dans les tissus avant de perdre toute son énergie cinétique. Il va alors interagir avec un électron environnant suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons γ d'énergie 511 keV émis en coïncidence, c'est-à-dire à 180° l'un de l'autre. Le principe de base de l'imagerie TEP repose sur la détection de ces deux photons par un système de collimateur électronique. S'il s'agit de photons issus d'une annihilation, alors ils seront détectés quasi-simultanément par deux détecteurs situés de part et d'autre d'une couronne de détection (**Figure 4**).

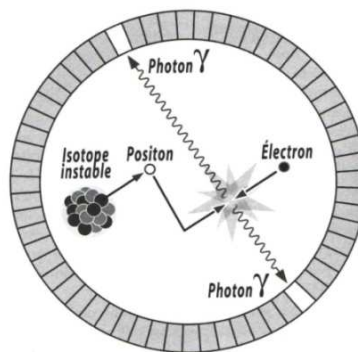


Figure 4. Détection de photons en coïncidence après annihilation d'un positon.¹

Illustration reproduite avec l'autorisation de l'auteur.

Sur la plupart des systèmes, une fenêtre de coïncidence comprise entre 10 et 20 ns permet aux calculateurs de distinguer les photons issus d'une annihilation des autres photons. Lorsque deux capteurs opposés détectent chacun un photon dans cet intervalle de temps, le calculateur estime qu'il y a coïncidence. Si et seulement si une annihilation se produit exactement au centre du champ d'examen, la détection sera simultanée mais dans les autres cas, il y aura un léger décalage entre les détecteurs. Ce décalage va permettre de localiser précisément le point

d'origine d'une annihilation (technique de « temps de vol »). L'acquisition et le traitement d'un grand nombre de données va générer une image tridimensionnelle. Sur la **Figure 5** sont représentées en rouge les zones émettant beaucoup de positons, donc à forte concentration en radiotracer (dans ce cas précis, un dérivé du glucose codé [^{18}F]FDG) et en vert, les zones peu émettrices donc contenant peu de radiotracer.

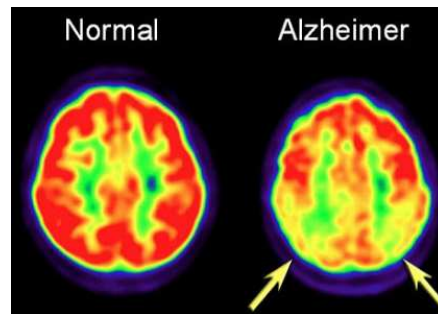


Figure 5. Images TEP obtenues avec le [^{18}F]FDG sur un sujet sain (à gauche) et sur un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (à droite).³

2.3. Performances de la Tomographie par Emission de Positons

Comme nous l'avons abordé précédemment, le positon parcourt une distance de quelques millimètres dans les tissus avant de s'annihiler. L'image finale donne donc la distribution statistique de ces points d'annihilation et non celle des émetteurs de positons (donc du radiotracer). C'est la raison pour laquelle la résolution spatiale des caméras TEP ne peut descendre en dessous de quelques millimètres. Cette distance correspond au parcours moyen du positon avant son annihilation et varie en fonction de l'énergie de la particule. Plus l'énergie est basse, plus le parcours moyen du positon avant son annihilation est court et meilleure est la résolution. Une autre limite intrinsèque en termes de résolution spatiale provient de la non-colinéarité des deux photons résultant de l'annihilation à cause d'un positon qui n'a pas intégralement perdu son énergie cinétique. Ce défaut de colinéarité peut être de l'ordre de $0,5^\circ$. La combinaison de ces deux phénomènes limite la résolution spatiale, propre à la détection en coïncidence, à 2 à 4 mm.

2.4. Production des émetteurs de positons

Contrairement aux isotopes employés en TEMP comme l'iode-131 ou le technétium-99m, les émetteurs de positons à vie brève sont souvent des radio-isotopes d'éléments biogéniques tels que l'oxygène, le carbone, l'azote, ou des halogènes comme le chlore, le brome et dans une moindre mesure le fluor. Cependant, ils n'existent pas à l'état naturel et sont donc produits artificiellement par des réactions de transmutation nucléaire faisant intervenir des particules de haute énergie produites dans des accélérateurs de particules. Il existe des accélérateurs de particules linéaires et circulaires mais c'est ce dernier type, également appelé cyclotron, qui est

³ "Dementia: role of MRI". 2012, F. Barkhof, M. Hazewinkel, M. Binnewijzend, R. Smithuis. Alzheimer Centre and Image Analysis Centre, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam and the Rijnland Hospital, Leiderdorp, Pays-Bas.

le plus fréquemment utilisé aujourd'hui. Le schéma de principe d'un cyclotron de première génération et la photo d'un cyclotron actuel sont donnés dans la **Figure 6**.

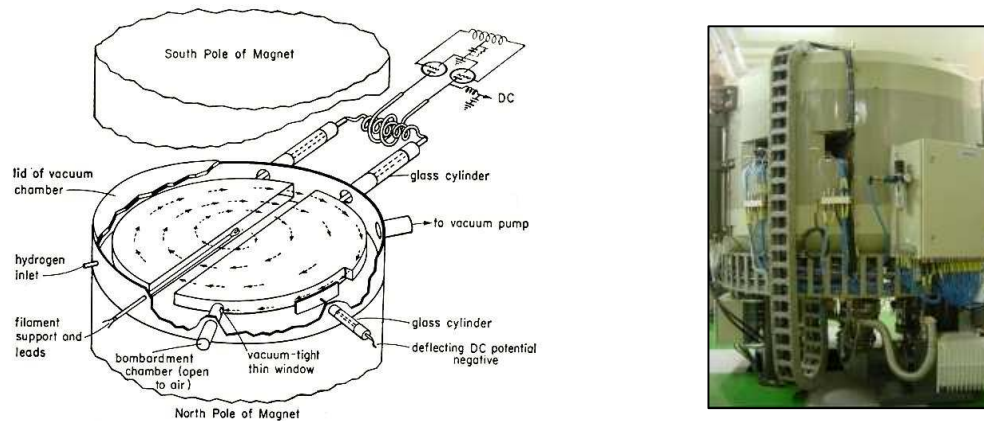
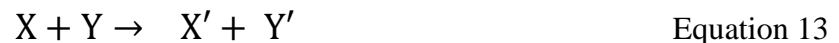


Figure 6. Schéma de principe d'un cyclotron de première génération (à gauche)⁴ et photo d'un cyclotron actuel commercialisé par la société IBA (à droite).

Le cyclotron est un accélérateur électromagnétique à haute fréquence inventé par Ernest Orlando Lawrence en 1929 aux Etats-Unis. Il utilise l'action combinée d'un champ magnétique et d'un champ électrique pour accélérer un faisceau de particules chargées (protons ou deutons). Ces particules sont d'abord introduites au centre d'une enceinte où règne un vide très poussé. Sous l'action du champ magnétique, elles se mettent ensuite à décrire une trajectoire circulaire au centre du cyclotron et se rapprochent du bord à mesure que leur vitesse augmente. Lorsque l'énergie emmagasinée est suffisante, le faisceau de particules est dirigé sur une cible où se produit une réaction de transmutation nucléaire (**Equation 13**). Par rapport aux appareils de première génération, les cyclotrons actuels sont plus fiables grâce à une meilleure automatisation et permettent d'accélérer des particules chargées négativement.



X: élément stable constituant la cible

Y: particule incidente

X': radioélément généré

Y': particule créée après la réaction

Le carbone-11 peut ainsi être obtenu en bombardant de l'azote-14 avec des protons (**Equation 14**).



Par convention, on écrit cette réaction de transmutation nucléaire $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. Les propriétés des principaux radio-émetteurs β^+ employés en médecine nucléaire sont rassemblées dans le **Tableau 3 (chapitre 1, section 2.3)**.

⁴ P. A. Tripler, *Physics for Scientists and Engineers: Vol. 2: Electricity and Magnetism*, Ed. W. H. Freeman, **1998**.

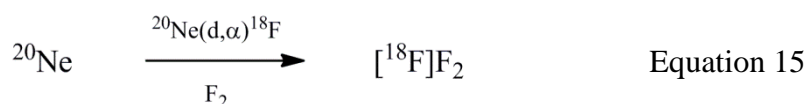
Chapitre 3: Le fluor-18

1. Modes d'obtention du fluor-18

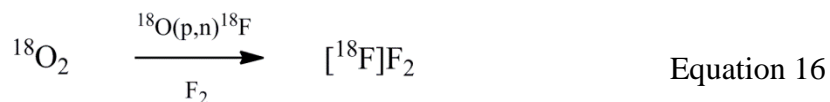
Avec une période de 109,8 minutes, le fluor-18 est le seul radio-émetteur de positons légers (^{13}N , ^{11}C , ^{18}F et ^{15}O) à pouvoir être utilisé en dehors de son lieu de production. Il permet de réaliser des radio-synthèses pouvant nécessiter une ou plusieurs étapes sans perdre par décroissance une trop grande partie de l'activité produite. Par ailleurs, ses positons possèdent une énergie maximale relativement basse (0,63 MeV), ce qui se traduit par un parcours moyen dans les tissus avant annihilation assez court (0,5 mm dans l'eau ou les tissus) et donc une meilleure résolution de l'image. Ces raisons expliquent pourquoi le fluor-18 est actuellement l'un des radionucléides les plus utilisés en imagerie TEP. Sa présence dans certaines molécules d'intérêt biologique en fait également un radioisotope de choix pour l'industrie radiopharmaceutique. En fonction du type de radio-marquage envisagé, le fluor-18 sera utilisé soit sous forme électrophile avec le fluor moléculaire $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, soit sous forme nucléophile avec les ions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$.

1.1. Production de fluor-18 électrophile

Le fluor-18 électrophile $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ est principalement produit par la transmutation nucléaire $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ mais aussi $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$. Dans la première méthode, $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ est obtenu en bombardant une cible contenant du néon-20 gazeux avec des noyaux de deutérium ou deutons (**Equation 15**).



Au cours de l'irradiation, le fluor moléculaire généré a tendance à s'adsorber sur la cible, ce qui rend son extraction difficile. Pour remédier à ce problème, du fluor gazeux non radioactif (fluor-19) est introduit au mélange dans des proportions allant de 0,1 à 0,5 % en volume (par rapport au néon) afin d'entraîner quantitativement les molécules de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$.⁵ De même, des pré-irradiations visant à passiver la surface de la cible et limiter les phénomènes d'adsorption peuvent être effectuées. Dans ces conditions et en utilisant par exemple du néon contenant 0,4 % de F_2 à une pression de 11 bars, il est possible de récupérer environ 75 % de l'activité produite, essentiellement sous forme de fluor moléculaire $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Néanmoins, la dilution isotopique engendrée par l'ajout de fluor-19 se traduit par une très faible activité spécifique, comprise entre 0,05 et 0,35 GBq/ μmol . A noter également que des produits indésirables tels que $[^{18}\text{F}]\text{NF}_3$ ou $[^{18}\text{F}]\text{CF}_4$ peuvent se former au cours de l'irradiation si le néon utilisé contient des traces d'oxydes d'azote ou de dioxyde de carbone. Dans la seconde méthode, la cible est cette fois-ci remplie d'oxygène-18 gazeux qui est bombardé avec des protons (**Equation 16**).⁶



⁵ V. Casella, T. Ido, A. P. Wolf, J. S. Fowler, R. R. Mac Gregor, T. J. Ruth. *J. Nucl. Med.* **1980**, 21, 750.

⁶ R. J. Nickles, M. E. Daube, T. J. Ruth. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1984**, 35, 117.

Comme dans la première méthode, le fluor-18 se retrouve adsorbé sur les parois de la cible à la fin de l'irradiation. La fraction d'oxygène-18 n'ayant pas réagi est recyclée par liquéfaction cryogénique et une seconde irradiation est réalisée en présence d'un gaz inerte et de fluor-19, ce qui permet l'échange avec le fluor-18. Là encore, les radioactivités spécifiques obtenues sont diminuées par la dilution isotopique. Ces contraintes ont encouragé le développement de méthodes alternatives plus performantes. En l'occurrence, il existe une méthode de production « post-target » de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, plus complexe mais donnant une activité spécifique pouvant atteindre 55 GBq/ μmol . Ce procédé, développé au centre de Turku,⁷ fait intervenir du fluorométhane $\text{CH}_3[^{18}\text{F}]\text{F}$ mélangé à de faibles quantités (0,3-1,2 μmol) de fluor non radioactif puis soumis à une décharge électrique dans une enceinte remplie de néon (**Schéma 1**).

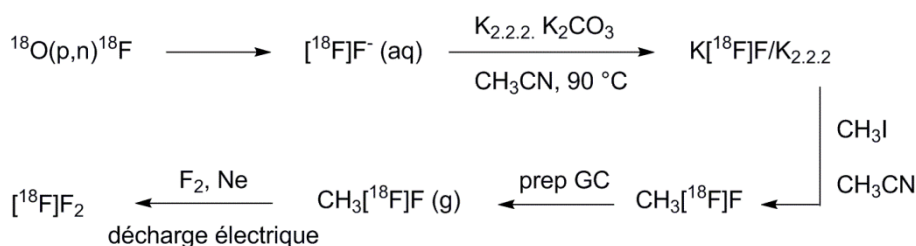


Schéma 1. Méthode de synthèse de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ à haute RAS.

1.2. Production de fluor-18 nucléophile

Le fluor-18 nucléophile est obtenu sous forme d'ions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ qui sont le plus souvent produits en bombardant une cible contenant de l'eau enrichie en ^{18}O par des protons (**Equation 17**).



Cette réaction est très largement employée en radiochimie car elle permet d'obtenir de grandes quantités de fluor-18 à haute activité spécifique (de 3 à 10 Ci/ μmol soit 111 à 370 GBq/ μmol).⁸ Les portes-cibles sont le plus souvent fabriqués en argent, en titane ou en acier inoxydable. L'irradiation est effectuée sous gaz inerte (azote ou hélium) à une pression comprise entre 2 et 5 bars, ce qui permet de limiter à la fois l'ébullition et la radiolyse de l'eau enrichie qui est un produit très coûteux (environ 100 € par irradiation pour 2 mL).

Il existe un autre procédé de production de $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ mettant en jeu la transmutation nucléaire $^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$. Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter d'eau enrichie en oxygène-18 mais il est indispensable de disposer d'un cyclotron suffisamment puissant pour pouvoir accélérer des noyaux d'hélium-3.

⁷ J. Bergman, O. Solin. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, 24, 677.

⁸ O. Solin, J. Bergman. *Appl. Radiat. Isot.* **1988**, 39, 1065.

2. La radiochimie du fluor-18

2.1. Réactions de substitution nucléophile

La réaction de substitution nucléophile fait intervenir du fluor-18 ionique, c'est-à-dire sous la forme d'ions fluorure $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. La densité électronique de l'ion fluorure étant très élevée (nucléophile dur selon la théorie « hard and soft acids and bases » ou HSAB), il est solvaté en milieu aqueux par plusieurs sphères de coordination qui diminuent fortement sa nucléophilie. Sa réactivité est également dépendante de la nature de son contre-ion. Ainsi, plus le cation est mou selon la théorie HSAB, meilleure est la nucléophilie de l'ion fluorure ; c'est pourquoi les fluorures de césium et de rubidium sont les plus réactifs. La première étape de toute réaction de fluoration nucléophile est d'obtenir des ions fluorures anhydres « activés ». Le plus souvent, l'ion $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ est piégé sur une résine échangeuse d'ion et l'eau enrichie en ^{18}O est recyclée. Ensuite, les ions fluorures sont élués de la résine avec une solution aqueuse d'un carbonate alcalin (potassium, césium) ou de tétrabutylammonium. La solution contenant les fluorures est alors évaporée sous courant d'hélium par distillation azéotropique de l'eau avec de l'acétonitrile. Le résidu est finalement mis en solution dans un solvant aprotique, le plus souvent de l'acétonitrile ou du DMSO, parfois du THF, avant de réagir avec un précurseur dit de marquage, c'est-à-dire une molécule acceptrice de fluor-18. Pour améliorer la solubilité des fluorures dans ces milieux et augmenter leur nucléophilie, on peut soit utiliser des cations mous tels que le rubidium ou le césium, soit ajouter un cryptant, c'est-à-dire un additif qui va chélater le contre-ion du fluorure et exalter la nucléophilie de ce dernier (ion nu). L'un des cryptants les plus couramment employés est le 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8] hexacosane, commercialisé sous le nom de Kryptofix[®] K_{2.2.2}, qui est sélectif de l'ion potassium (**Figure 7**).

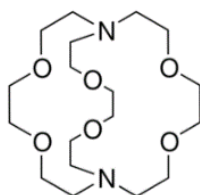


Figure 7. Structure du cryptant Kryptofix[®] K_{2.2.2}.

2.1.1. Réactions de substitution nucléophile en série aliphatique

2.1.1.1. Réactivité des sulfonates

Le groupement sulfonate répond à la formule générale $\text{R}_1\text{SO}_2\text{OR}_2$ lorsqu'il est sous sa forme ester (R_1 et R_2 représentent un groupe alkyle ou aryle). Lorsqu'il est sous sa forme ionique R_1SO_3^- , il a la particularité de pouvoir délocaliser sa charge négative sur les trois atomes d'oxygène portés par le soufre, ce qui lui confère une remarquable stabilité. Pour cette raison, le groupement sulfonate est un excellent groupement partant qui peut facilement être substitué par des agents nucléophiles tels que les ions hydroxyde, hydrure, amidure et halogénure. En

radiochimie, les sulfonates sont particulièrement intéressants pour le radiomarquage au fluor-18 puisqu'ils peuvent facilement subir des réactions de substitution nucléophile avec l'ion fluorure-18 [^{18}F]F⁻. Il s'agit donc de précurseurs de choix pour ce type de radiomarquage. Même si tous les sulfonates sont globalement de très bons groupements partants, il existe des différences de réactivité entre les divers représentants de cette famille. Par exemple le groupement triflate réagit près de 20 000 fois plus vite que le mésylate vis-à-vis de la solvolysé du 1-phényléthylsulfonate correspondant (**Tableau 5**).⁹

Groupement partant	K _{rel}	Groupement partant	K _{rel}
Triflate	1,4 x 10 ⁸	Iodure	91
Nosylate	4,4 x 10 ⁵	Bromure	14
Tosylate	3,7 x 10 ⁴	Chlorure	1
Mésylate	3,0 x 10 ⁴	Fluorure	9 x 10 ⁻⁶

Tableau 5. Comparaison de la vitesse de solvolysé de différents 1-phényléthyl sulfonates et halogénures dans EtOH-H₂O 80/20 à 75 °C.

Ceci s'explique par le caractère inductif attracteur très marqué des atomes de fluor du groupement triflate qui favorise la rupture de la liaison oxygène-carbone. Le groupement nosylate (*para*-nitrophénylsulfonate) est également un très bon groupement partant puisqu'il est environ 120 fois plus rapidement solvolysé que son homologue tosylate (*para*-méthylphénylsulfonate). Cette propriété est due à la présence du groupement nitro en position *para* qui attire à lui les électrons du cycle benzénique par un effet mésomère attracteur et favorise le départ du sulfonate. En ce qui concerne les groupements tosylate et mésylate, leur réactivité est comparable et même si elle paraît faible en comparaison des groupements triflate et nosylate, elle reste bien plus élevée que celle de l'ion iodure (entre 330 et 400 fois moins réactif) qui est le meilleur des nucléofuges halogénés en série aliphatique.

2.1.1.1.1. Réactivité des tosylates

Les tosylates figurent parmi les sulfonates les plus largement employés en radiochimie du fluor-18. Ce sont de très bons précurseurs de radiomarquage pouvant être facilement préparés à partir de l'alcool correspondant. De masse molaire élevée et souvent cristallins, ils sont relativement stables et faciles à manipuler. Par ailleurs, leur forte lipophilie leur permet d'être facilement séparés du produit fluoré correspondant par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La radiosynthèse du [^{18}F]fallypride, un radioligand des récepteurs dopaminergiques,

⁹ D. S. Joyce, J. A. Virgilio, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 2643.

fait intervenir un précurseur de type tosylate.¹⁰ En faisant réagir ce précurseur avec le complexe $K[^{18}\text{F}]\text{F}/K_{2.2.2}$ dans 1 mL d'acétonitrile à 100-120 °C pendant 20 minutes, il est possible d'obtenir le $[^{18}\text{F}]\text{fallypride}$ avec un rendement radiochimique satisfaisant de 14-27 % mesuré en fin de synthèse (EOS) en 55 minutes en incluant la purification du radiotraceur, soit un rendement corrigé de la décroissance (DCY) de 20-40 %. La RAS se situe entre 0,9 et 1,7 Ci/ μmol (33-63 GBq/ μmol) (**Schéma 2**).

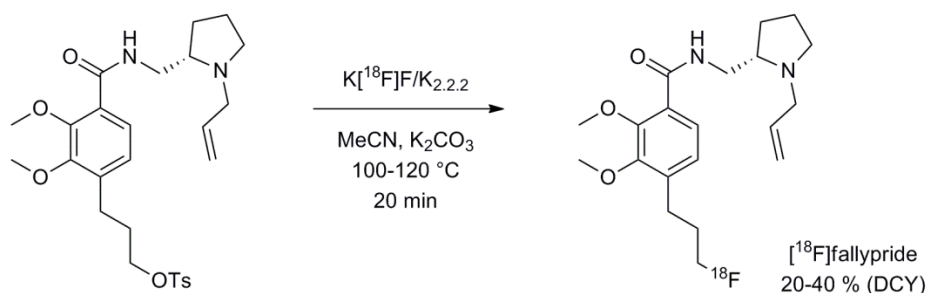


Schéma 2. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{fallypride}$ par $\text{S}_{\text{N}}2$ sur un précurseur tosylate.

2.1.1.1.2. Réactivité des mésylates

Les sulfonates de type mésylate ont une réactivité relativement similaire aux tosylates. Toutefois, ils ne sont pas toujours cristallins et peuvent parfois se décomposer à l'air libre. Leur principal inconvénient est de ne pas bien absorber les UV vers 254 nm contrairement à leurs homologues tosylés, ce qui complique la recherche des impuretés lors du contrôle qualité. Malgré cela, de nombreux radiomarquages font intervenir des précurseurs de type mésylate. On peut notamment citer la radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FP-CIT}$ qui sert à imager les transporteurs dopaminergiques dans le cerveau (**Schéma 3**).¹¹

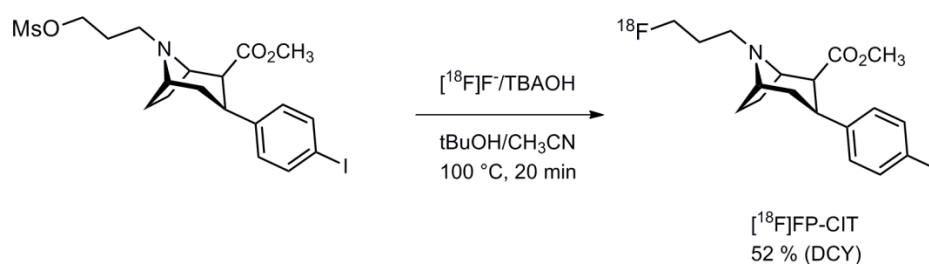


Schéma 3. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FP-CIT}$ par $\text{S}_{\text{N}}2$ sur un précurseur mésylate.

Le $[^{18}\text{F}]\text{FP-CIT}$ peut être obtenu en une seule étape et avec un bon rendement radiochimique de 31 % (EOS) après 80 minutes, soit un rendement corrigé de la décroissance de 52 %.¹² Le radiomarquage est réalisé à 100 °C avec $[^{18}\text{F}]\text{F}^-/\text{TBAOH}$ en présence de *tert*-butanol. Il a été suggéré que le *tert*-butanol favorise la réaction en réduisant l'interaction entre $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ et son contre-ion ammonium quaternaire ainsi qu'en affaiblissant la liaison carbone-oxygène du

¹⁰ J. Mukherjee, Z.-Y. Yang, M. K. Das, T. Brown. *Nuc. Med. Biol.* **1995**, 22, 283.

¹¹ H. K. Park, J. S. Kim, K. C. Im, S. J. Oh, M. J. Kim, J.-H. Lee, S. J. Chung, M. C. Lee. *Mov. Disord.* **2009**, 24, 237.

¹² S. J. Lee, S. J. Oha, D. Y. Chib, S. H. Kanga, H. S. Kilb, J. S. Kima, D. H. Moona. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, 34, 345.

mésylate (**Figure 8**). Toutefois, l'utilisation de ce solvant ainsi que son mécanisme d'action restent relativement controversés et les résultats obtenus ne sont pas toujours reproductibles.

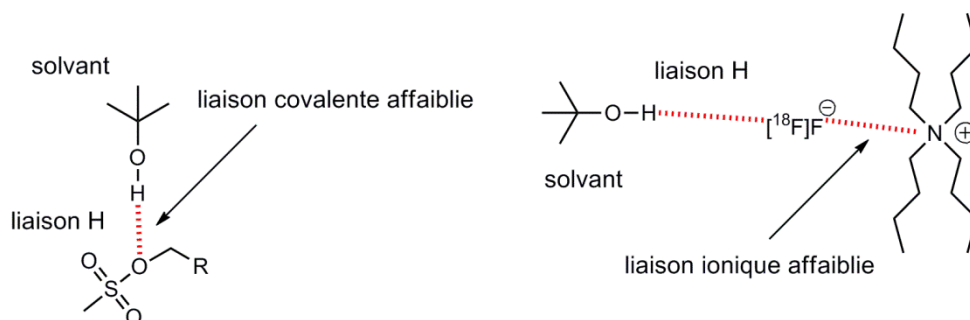


Figure 8. Effet d'assistance du t -BuOH dans la substitution nucléophile.

2.1.1.1.3. Réactivité des nosylates

La 3'-désoxy-3'- $[^{18}\text{F}]$ fluorothymidine ($[^{18}\text{F}]$ FLT) est un important radiotracer utilisé pour imager la prolifération cellulaire et diagnostiquer certains cancers.¹³ En ce qui concerne sa préparation, Grieson *et al.*¹⁴ ont rapporté une radiosynthèse à partir d'un précurseur nosylate protégé par des groupements 2,4-diméthoxybenzyle (DMBn) et diméthoxytrityle (DMTr) (**Schéma 4**). La radiosynthèse est effectuée à 100 °C dans l'acétonitrile en présence du complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}/\text{K}_{2.2.2}$. Une fois le fluor-18 incorporé, le substrat est déprotégé par action du CAN (nitrate d'ammonium et de cérium) pour former la $[^{18}\text{F}]$ FLT. Avec cette méthode, le radiotracer est obtenu en 96 minutes avec un rendement radiochimique de 8 % (EOS) soit un rendement corrigé de la décroissance de 13 %. La radioactivité spécifique du radiotracer est supérieure à 1 Ci/ μmol (37 GBq/ μmol). Après l'oxydation, le CAN n'ayant pas réagi est précipité par addition de bicarbonates pour former de l'hydroxyde de cérium ($\text{Ce}(\text{OH})_3$) qui est ensuite éliminé par microfiltration afin d'éviter le colmatage de la colonne HPLC.

Dans une méthode automatisée décrite par Oh *et al.*,¹⁵ le noyau pyrimidine précurseur de départ est protégé par un groupement Boc qui présente l'avantage d'être clivable en conditions légèrement acides, ce qui limite les réactions secondaires observées avec le CAN. Ainsi, en partant d'un précurseur nosylate, dont le noyau pyrimidine et l'alcool en position 5' sont respectivement protégés par des groupements Boc et diméthoxytrityl (DMTr), on obtient la $[^{18}\text{F}]$ FLT en seulement 60 minutes avec un très bon rendement radiochimique de 33 % (EOS) soit un rendement corrigé de la décroissance de 50 % (**Schéma 4**). En plus de ces améliorations, cette méthode est plus facile à automatiser car la déprotection des fonctions alcool et imide ne génère pas de précipité, ce qui permet d'injecter directement le milieu réactionnel sur la colonne HPLC.

¹³ L. B. Been, A. J. H. Suurmeijer, D. C. P. Cobben, P. L. Jager, H. J. Hoekstra, P. H. Elsinga. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2004**, 31, 1659.

¹⁴ J. R. Grierson, A. F. Shields. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27, 143.

¹⁵ S. J. Oh, C. Mosdzianowski, D. Y. Chic, J. Y. Kima, S. H. Kanga, J. S. Ryua, J. S. Yea, D. H. Moona. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, 31, 803.

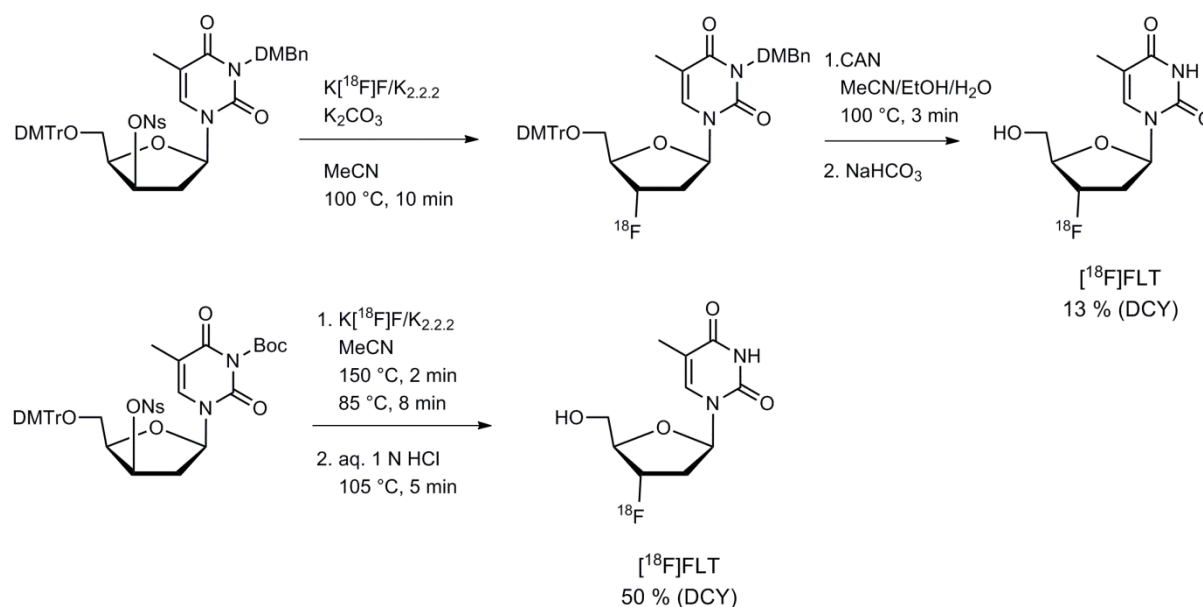


Schéma 4. Comparaison de deux méthodes de radiosynthèse de la [18F]FLT.

2.1.1.1.4. Réactivité des triflates

Comme nous l'avons évoqué plus haut, le groupement triflate (ou trifluorométhanesulfonate) est l'un des plus réactifs de la série des sulfonates. Il a contribué à grandement améliorer la radiosynthèse du 2-désoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose ([18F]FDG), qui est à l'heure actuelle le plus important radiopharmaceutique marqué par un émetteur de positon puisque l'on estime que la fréquence d'utilisation des autres radiopharmaceutiques utilisés en TEP atteint seulement 10 % de celle du FDG. En 1995, il représentait à lui seul près de 200 utilisations par semaine sur l'ensemble des cyclotrons européens.¹⁶ Le [18F]FDG est notamment employé en oncologie pour la détection et le diagnostic de certaines tumeurs car les cellules cancéreuses consomment beaucoup plus de glucose que les cellules normales.

La première radiosynthèse du [18F]FDG, développée par Ido *et al.*¹⁷ en 1978, fait intervenir l'addition électrophile du fluor-18 moléculaire [18F]F₂ sur la liaison double du (D)-3,4,6-tri-O-acétylglyceral. Cependant, cette méthode donne lieu à la formation de 20 % d'un mélange de 2-désoxy-2-[18F]fluoro-mannose ([18F]FDM) et de sa version non marquée au fluor-18 (**Schéma 5**). Avec cette méthode, la radiosynthèse du [18F]FDG dure près de 2 heures et le rendement radiochimique s'élève à seulement 8 % (EOS) soit un rendement corrigé de la décroissance de 17 %. De plus, l'utilisation de [18F]F₂ engendre une faible RAS, de l'ordre de 0,12 mCi/μmol (4,4 GBq/mmol).

¹⁶ G. J. Meyer, S. L. Waters, H. H. Coenen, A. Luxen, B. Mazière, B. Langström. *Eur. J. Nucl. Med.* **1995**, 22, 1420.

¹⁷ T. Ido, C. N. Wan, V. Casella, J. S. Fowler, A. P. Wolf, M. Reivich, D. E. Kuhl. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1978**, 14, 175.

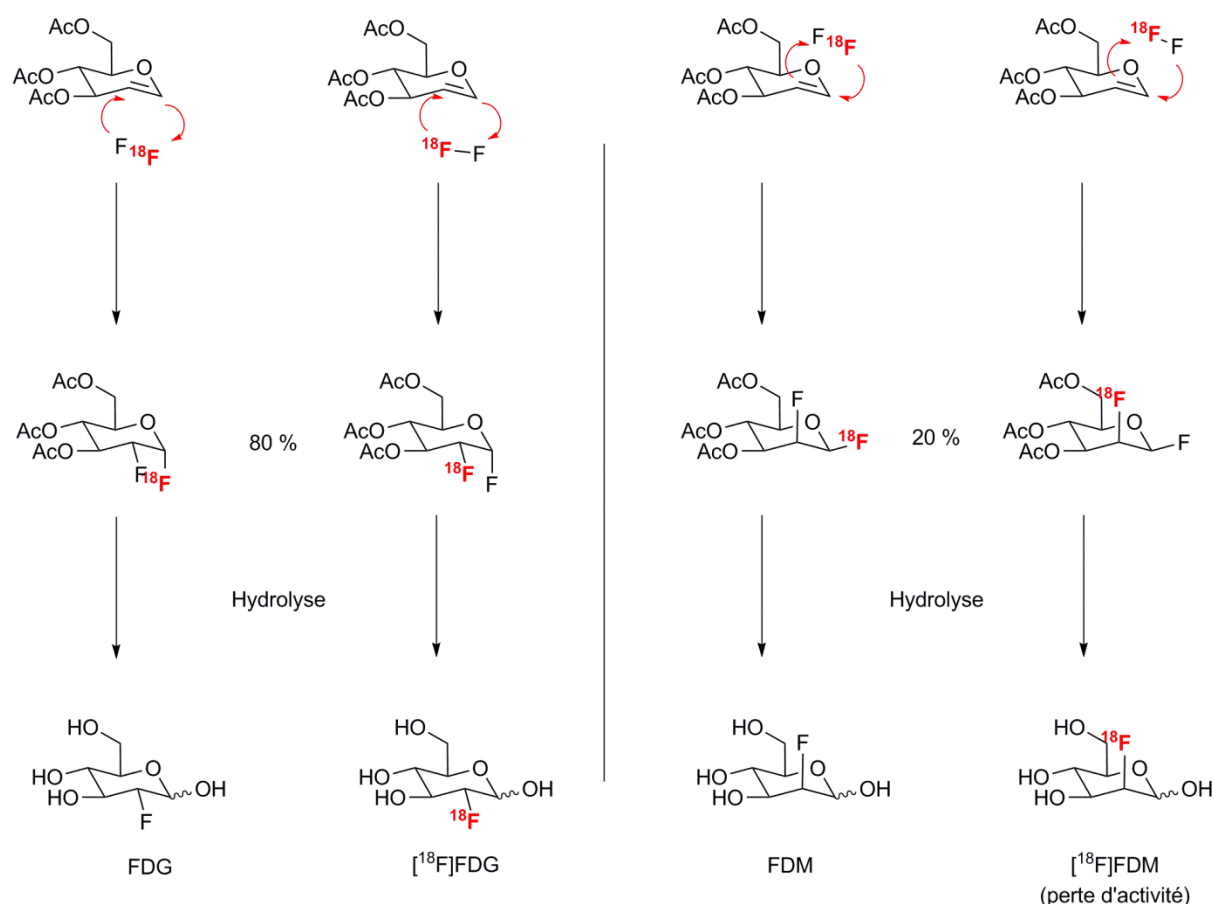


Schéma 5. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ selon la voie électrophile.

Ces limitations ont encouragé le développement de méthodes plus sélectives et donnant de meilleurs rendements radiochimiques. Avec la méthode actuelle, mise au point initialement par Hamacher et *al.*¹⁸ et utilisant un précurseur triflate, la radiosynthèse et la purification sont achevées en 50 minutes et permettent d'obtenir exclusivement le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ avec un excellent rendement radiochimique de 44 % (EOS) soit un rendement corrigé de 60 % (**Schéma 6**).

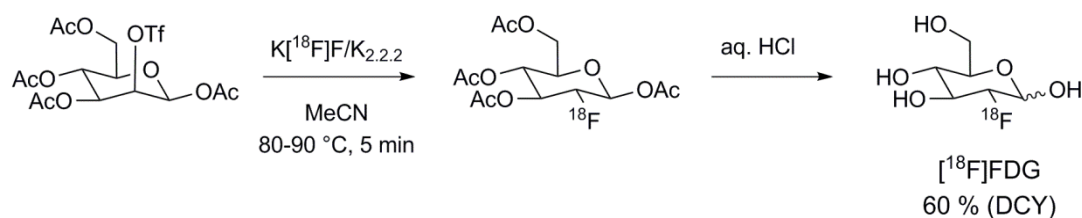


Schéma 6. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ selon la voie nucléophile.

La méthode consiste à faire réagir le 1,2,4,6-tétra-*O*-acétyl-2-trifluorométhanesulfonyl- β -D-mannopyranose avec $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}$ en présence de Kryptofix® $\text{K}_{2.2.2}$ dans l'acétonitrile à 80-90 °C pendant 5 minutes puis de déprotéger les groupements hydroxyles en présence d'acide chlorhydrique.

¹⁸ K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stocklin. *J. Nucl. Med.* **1986**, 27, 235.

2.1.1.2. Réactivité des halogénures d'alkyle

La substitution nucléophile par échange d'un halogène est une autre méthode d'incorporation du fluor-18. Les halogènes sont toutefois de moins bons groupements partants que les sulfonates et l'ordre de réactivité suivant est admis : $I > Br > Cl > F$.¹⁹ Par exemple, la radiosynthèse du [¹⁸F]LBT-999, un radioligand des transporteurs dopaminergiques dérivé de la cocaïne, fait intervenir la substitution nucléophile de [¹⁸F]F⁻ sur un précurseur chloré en présence de Kryptofix® K_{2.2.2} dans le DMSO à 165 °C pendant 10 minutes (Schéma 7).²⁰ Le radiotraceur peut ainsi être obtenu en 85-90 minutes avec un rendement radiochimique de 10-16 % (EOS), soit un rendement corrigé de la décroissance de 17-27 %, et une RAS comprise entre 1 et 3 Ci/μmol (37 à 111 GBq/μmol).

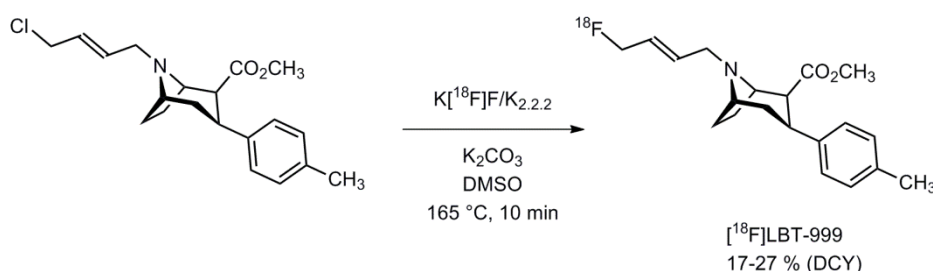


Schéma 7. Radiosynthèse du [¹⁸F]LBT-999 par S_N2 sur un précurseur chloré.

2.1.2. Réactions de substitution nucléophile en série aromatique

Les substitutions nucléophiles en série aromatique (S_NAr) sont plus contraignantes qu'en série aliphatique puisqu'elles nécessitent un appauvrissement du noyau aromatique en électrons par la présence de substituants électroattracteurs tels que les groupes cyano, nitro ou carbonyle en position *ortho* et *para* du groupement partant. En ce qui concerne les groupements partants, les plus employés sont NO₂, Br et -NR₃⁺. A noter que le fluor est généralement considéré comme un excellent groupement partant en série aromatique (sur la base d'un mécanisme S_NAr), contrairement à son positionnement en série aliphatique (voir ci-dessus). Toutefois, dans le cas de noyaux aromatiques faiblement activés, un autre mécanisme peut être considéré (mécanisme « benzyne » où l'étape limitante est la rupture de la liaison carbone-halogène) et dans ce cas, l'ordre de réactivité est le même que celui en série aliphatique¹⁹. Il existe aussi une famille de composés assez récents, les sels d'iodonium, qui permettent de marquer au fluor-18 des cycles aromatiques non activés.

2.1.2.1. Réactivité des fluorures d'aryle

Comme cela a déjà été évoqué plus haut, le fluor est l'un des meilleurs groupements partants en série aromatique. Néanmoins, son utilisation pour le marquage au fluor-18 n'est pas adaptée lorsqu'il est nécessaire d'obtenir une haute radioactivité spécifique. En effet, le précurseur qui

¹⁹ M. B. Smith and J. March. *March's Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms, and Structure* (5th ed), Ed. Wiley-Interscience, 2001.

²⁰ F. Dollé, J. Helfenbein, F. Hinnen, S. Mavel, Z. Mincheva, W. Saba, M.-A. Schollhorn-Peyronneau, H. Valette, L. Garreau, S. Chalon, C. Halldin, J.-C. Madelmont, J.-B. Deloye, M. Bottlaender, J. Gailliard, D. Guilloteau, P. Emond. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, 50, 716.

contient du fluor-19 est toujours en net excès par rapport aux ions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ ce qui provoque une importante dilution isotopique dans la mesure où l'on recueille un mélange de radiotraceur et de précurseur. Malgré ces limitations, des tentatives de radiomarquage de précurseurs fluorés ont été entreprises. Les premiers exemples connus concernent la synthèse du $[^{18}\text{F}]$ halopéridol, un radiotraceur utilisé pour imager les récepteurs dopaminergiques, synthétisé par Kilbourn *et al.*²¹ en 1984 (**Schéma 8**).

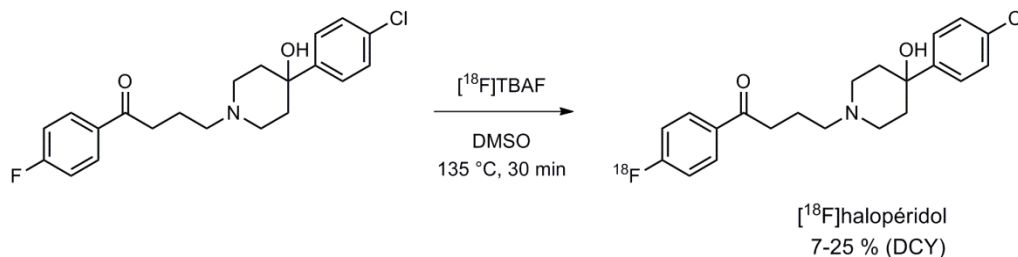


Schéma 8. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]$ halopéridol par échange fluor-19/fluor-18.

L' $[^{18}\text{F}]$ halopéridol peut être obtenu en 60 minutes par échange $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ avec $[^{18}\text{F}]\text{TBAF}$ à 135 °C dans le DMSO. Toutefois, les faibles rendements radiochimiques, compris entre 5 et 17 % (EOS), soit des rendements corrigés de la décroissance de 7-25 %, associés à une RAS très basse, de l'ordre de 3,5 mCi/ μmol (129,5 MBq/ μmol), limitent son utilisation pour l'imagerie cérébrale chez l'Homme. L'échange fluor-19/fluor-18 a également été utilisé par Windhorst *et al.*²² pour la synthèse du $[^{18}\text{F}]$ flumazénil (**Schéma 9**), un radiotraceur des récepteurs aux benzodiazépines centraux (CBR). Il peut être obtenu avec un rendement de fluoration de 44 % (DCY) mais là encore, la faible RAS de 10 mCi/ μmol (370 MBq/ μmol) limite les applications cliniques.

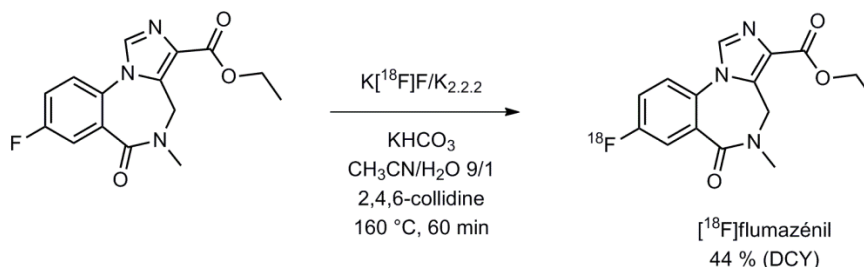


Schéma 9. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]$ flumazénil par échange fluor-19/fluor-18.

2.1.2.2. Réactivité des nitroarènes

Le $[^{18}\text{F}]$ flumazénil peut également être obtenu par substitution nucléophile aromatique sur un précurseur nitré comme exposé dans le **Schéma 10**. Ryzhikov *et al.*²³ décrivent avec cette méthode l'obtention de $[^{18}\text{F}]$ flumazénil en 75-80 minutes avec un rendement radiochimique de 19 % (EOS), soit un rendement corrigé de la décroissance de 30 %, et une RAS de l'ordre de 5 Ci/ μmol (185 GBq/ μmol), c'est-à-dire environ 1500 fois plus importante qu'avec l'échange $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$. La réaction fait intervenir un complexe σ tétraédrique non aromatique plus ou moins

²¹ M. R. Kilbourn, M. J. Welch, C. S. Dence, T. J. Tewson, H. Saji, M. Maeda. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1984** 35, 591.

²² A. D. Windhorst, R. P. Klok, C. L. Koolen, G. W. M. Visser, J. D. M. Herscheid. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, 44, S930.

²³ N. N. Ryzhikov, N. Seneca, R. N. Krasikova, N. A. Gomzina, E. Shchukin, O. S. Fedorova, D. A. Vassiliev, B. Gulyás, H. Hall, I. Savic, C. Halldin. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32, 109.

stabilisé, qui retrouve son aromaticité dans un deuxième temps en expulsant le nucléofuge, c'est-à-dire le groupement nitro. Il est intéressant de constater que dans le cas du [^{18}F]flumazénil, la formation du complexe σ est défavorisée car la charge négative n'est pas stabilisée par la fonction amide positionnée en *meta* (**Schéma 10**). Le cycle imidazole contribue à accentuer cette déstabilisation par son caractère mésomère donneur qui enrichit la densité électronique du cycle benzénique. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de chauffer à haute température (160 °C) pour effectuer cette réaction. En plus de nécessiter des températures élevées, qui ne sont pas toujours compatibles avec certains groupements fonctionnels, ce type de radiosyntheses peut être délicat au stade de la purification car très souvent, le radioligand fluoré et le précurseur nitré présentent une polarité similaire en HPLC, ce qui rend leur séparation parfois difficile.

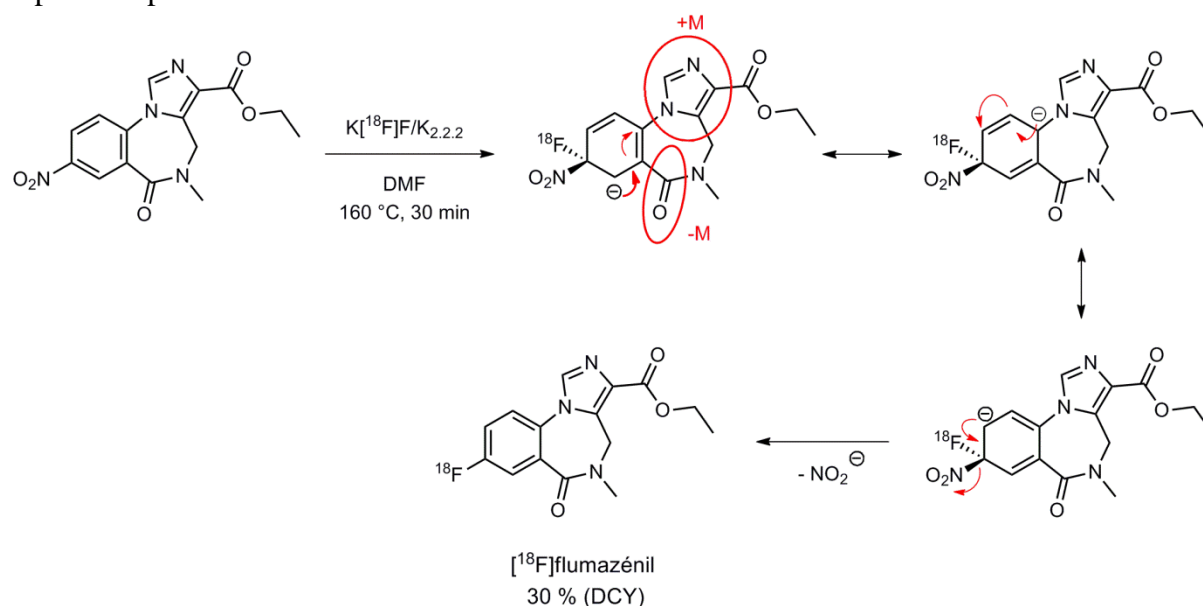


Schéma 10. Mécanisme réactionnel de la radiosynthèse du [^{18}F]flumazénil à partir d'un précurseur nitré.

2.1.2.3. Réactivité des sels d'ammonium quaternaire

Les sels d'ammonium quaternaire permettent le radiomarquage au fluor-18 de certaines molécules. La radiosynthèse de [^{18}F]F-A-85380 par exemple, un radioligand des récepteurs nicotiques, fait intervenir un groupement partant de type triméthylammonium pour introduire le fluor-18 (**Schéma 11**).²⁴

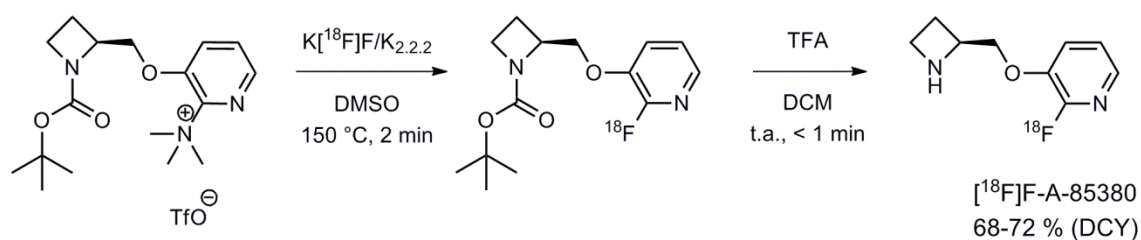


Schéma 11. Radiosynthèse bi-étapes du [^{18}F]F-A-85380 à partir d'un sel d'ammonium quaternaire.

²⁴ F. Dollé, L. Dolci, H. Valette, F. Hinnen, F. Vaufrey, I. Guenther, C. Fuseau, C. Coulon, M. Bottlaender, C. Crouzel. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2251.

La radiosynthèse complète est réalisée en 50-55 minutes et permet d'obtenir le [^{18}F]F-A-85380 avec un bon rendement radiochimique de 50-52 % (EOS), soit un rendement corrigé de la décroissance de 68-72 %, et une radioactivité spécifique élevée, comprise entre 4 et 7 Ci/ μmol (148-259 GBq/ μmol).

2.1.2.4. Réactivité des sels d'iodonium

Les sels d'iodonium font partie de la famille des réactifs de l'iode hypervalent. Ils connaissent un intérêt croissant en radiochimie car ils permettent le marquage au fluor-18 de positions défavorables, notamment sur des noyaux aromatiques qui ne sont pas appauvris en électrons.^{25,26,27} Les sels d'iodonium sont des composés ioniques dans lesquels l'atome d'iode, chargé positivement, est lié de façon covalente à deux groupements carbonés. Le contre-ion est le plus souvent un halogénure, un triflate ou un tétrafluoroborate. Il est important de noter que la nature de ce contre-ion influence la solubilité et la réactivité du sel. En l'occurrence, les halogénures sont généralement moins solubles et moins réactifs que les triflates ou les tétrafluoroborates.²⁸ Zhang *et al.*²⁷ sont parvenus à marquer quasi-exclusivement le fluorobenzène (96 %) au détriment du 4-méthoxyfluorobenzène (6 %) avec un rendement de fluoration de 79 % (DCY) (Schéma 12).

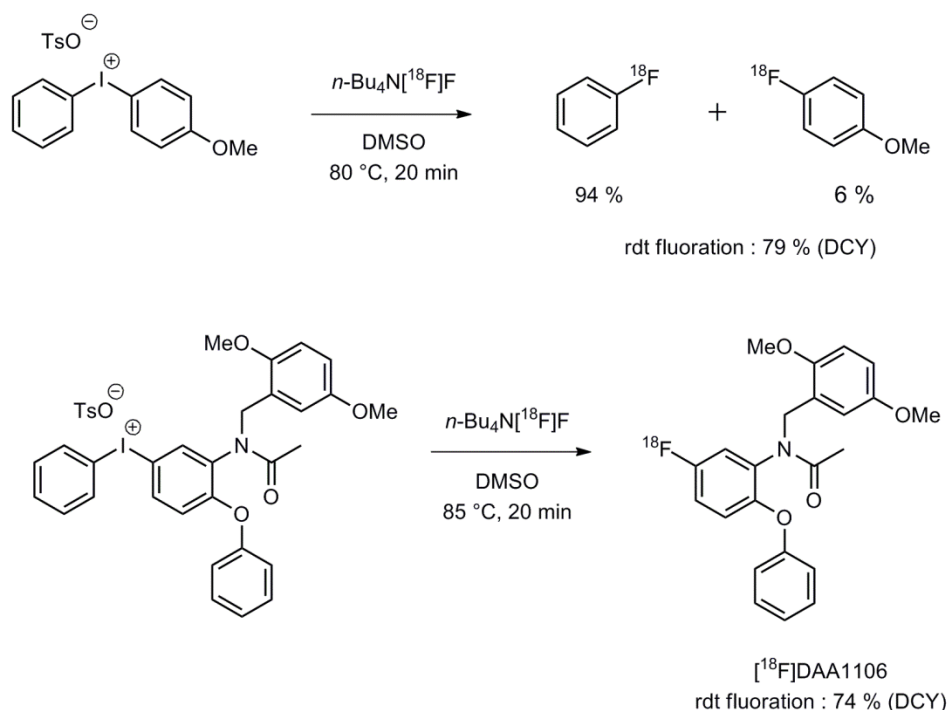


Schéma 12. Substitution nucléophile régiosélective sur des sels d'iodonium (en haut) ; radiosynthèse de [^{18}F]DAA1106 (en bas).

La même équipe a utilisé les sels d'iodonium pour préparer [^{18}F]DAA1106, un radioligand de la TSPO 18 kDa. La radiosynthèse peut être réalisée en faisant réagir le sel d'iodonium

²⁵ B. C. Lee, K. C. Lee, H. Lee, R. H. Mach, J. A. Katzenellenbogen. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 514.

²⁶ B. C. Lee, C. S. Dence, H. Zhou, E. E. Parent, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, 36, 147.

²⁷ M.-R. Zhang, K. Kumata, K. Suzuki. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 8632.

²⁸ M. Bielawski, D. Aili, B. Olofsson. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4602.

correspondant avec le [^{18}F]TBAF dans le DMSO à 85 °C (**Schéma 12**).²⁹ Cette température de réaction, relativement peu élevée, constitue un réel avantage et permet par exemple le marquage de molécules thermosensibles. [^{18}F]DAA1106 peut ainsi être obtenu avec un rendement corrigé de la décroissance de 74 % avec cette méthode. Néanmoins, la synthèse des sels d'iodonium n'est pas toujours évidente en raison de leur grande réactivité. En particulier, la purification de ces composés est délicate car ils ne sont pas stables sur gel de silice, ce qui limite le développement de ces précurseurs.

2.2. Réactions d'addition électrophile aromatique

Historiquement, le fluor [^{18}F]F₂ a été utilisé dans les premières fluorations électrophiles mais d'autres agents moins réactifs et plus sélectifs ont été développés depuis. A la différence des substitutions nucléophiles, les fluorations électrophiles font généralement intervenir des composés gazeux entraînés par un gaz vecteur tel que le néon et contenant du fluor non radioactif, ce qui diminue très fortement la radioactivité spécifique des radiotraceurs. De même, le fait que seulement un atome de la molécule de [^{18}F]F₂ soit du fluor-18 diminue dès le départ le rendement maximal de moitié. S'il est vrai que la majorité des premiers radiotraceurs étaient produits par fluoration électrophile, comme cela a été le cas pour le [^{18}F]FDG qui était obtenu par fluoration d'un glycol, le développement des méthodes par substitution nucléophile a permis d'obtenir de bien meilleures RAS et a relégué la voie électrophile au second plan. Ainsi, il s'agit aujourd'hui d'une méthode relativement peu utilisée, hormis pour la synthèse de quelques radiotraceurs spécifiques. Les agents électrophiles tels que [^{18}F]F₂ ou l'[*¹⁸F]hypofluorure d'acétyle réagissent bien sur les systèmes aromatiques mais le plus souvent, des mélanges de régioisomères sont obtenus en raison de la faible sélectivité de ces réactifs.

L'un des radiotraceurs les plus importants obtenu par fluoration électrophile aromatique est la [^{18}F]F-L-DOPA (L-3,4-dihydroxy-6-[^{18}F]fluorophénylalanine) qui permet l'étude de la neurotransmission dopaminergique présynaptique.^{30,31} Les premières radiosynthèses de la [^{18}F]F-L-DOPA faisaient intervenir l'action de [^{18}F]F₂ gazeux sur la L-DOPA non protégée à -65 °C dans le fluorure d'hydrogène (**Schéma 13**).³² Ces conditions particulièrement drastiques n'étaient pas adaptées à une fluoration régiosélective car il se formait seulement 21 % du produit désiré et près de 14 % d'un mélange de régioisomères difficilement séparables en HPLC. L'utilisation d'acides de Lewis tels que BF₃ ou AsF₅ a permis d'améliorer le rendement global et d'augmenter la proportion de [^{18}F]F-L-DOPA mais là encore, la séparation des différents produits fluorés restait difficile.

Par la suite, des précurseurs organométalliques à base de métaux de transition ont été développés afin de mieux orienter la fluoration. Grâce à leur caractère inductif donneur, les métaux augmentent la densité électronique portée par le carbone à fluorer ce qui se traduit par une fixation régiosélective du fluor-18. En ce qui concerne la radiosynthèse de la [^{18}F]F-L-

²⁹ M.-R. Zhang, K. Kumata, K. Suzuki. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 8632.

³⁰ L. Wahl, C. Nahmias. *J. Nucl. Med.* **1996**, 37, 432.

³¹ Y. Agid, *Lancet.* **1991**, 337, 1321.

³² G. Firnau, R. Chirakal, E. S. Garnett. *J. Nucl. Med.* **1984**, 25, 1228.

DOPA, diverses méthodes faisant intervenir des précurseurs organométalliques ont été développées.^{33,34,35} L'une d'entre elles, développée par Dollé *et al.*,³⁶ fait intervenir la fluoration électrophile à température ambiante d'un précurseur stannylé protégé par des groupements Boc (Schéma 14).

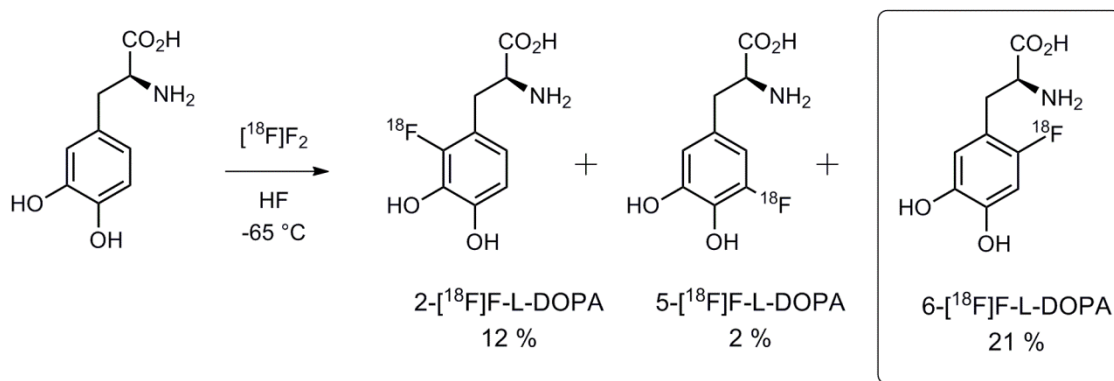


Schéma 13. Radiosynthèse de la 6-[¹⁸F]F-L-DOPA par action directe de [¹⁸F]F₂ sur la L-DOPA.

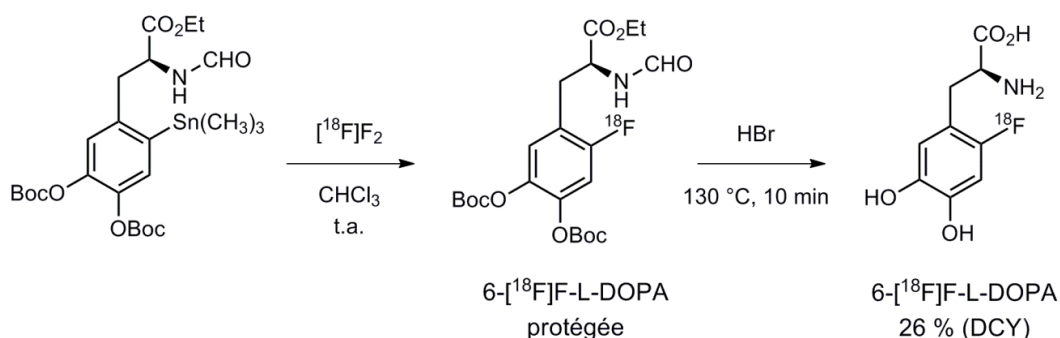


Schéma 14. Radiosynthèse de la 6-[¹⁸F]F-L-DOPA par action de [¹⁸F]F₂ sur un précurseur stannylé.

Une fois le radiomarquage réalisé, les groupements Boc et la fonction ester sont hydrolysés avec HBr à 48 %. Avec cette procédure, il est possible d'obtenir la [¹⁸F]F-L-DOPA avec un rendement radiochimique de 26 % (DCY) sachant que le rendement maximum est de 50 %. Par ailleurs, l'activité spécifique du radiotraceur est de 0,12 mCi/μmol soit 4,44 MBq/μmol. Cette méthode de synthèse permet d'obtenir la [¹⁸F]F-L-DOPA en 45-50 minutes.

³³ M. J. Adam, S. Jivan. *Appl. Rad. Isot.* **1988**, 39, 1203.

³⁴ A. Luxen, J. R. Barrio, G. T. Bida, N. Satyamurthy. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1986**, 23, 1066.

³⁵ A. Luxen, M. B. Perlmutter, G. T. Bida *et al. Appl. Rad. Isot.* **1990**, 41, 275.

³⁶ F. Dollé, S. Demphel, F. Hinnen, D. Fournier, F. Vaufrey, C. Crouzel. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, 61, 105.

Chapitre 4: La protéine de translocation 18 kDa

1. Description de la protéine TSPO 18 kDa

1.1. Structure de la protéine

La protéine de translocation TSPO 18 kDa, anciennement désignée par PBR pour « Peripheral Benzodiazepine Receptor », est une protéine transmembranaire constituée par l'enchaînement de 169 acides aminés.^{37,38,39} Elle est particulièrement riche en résidus tryptophane ce qui lui confère une certaine lipophilie. La protéine TSPO 18 kDa est localisée dans la membrane mitochondriale externe des cellules gliales où elle forme un complexe trimérique avec un canal anionique voltage dépendant (VDAC) de 32 kDa et un transporteur de nucléotide adénine (ANC) de 30 kDa.⁴⁰ Les domaines transmembranaires de TSPO 18 kDa sont constitués de cinq hélices α traversant la bicouche hydrolipidique sur toute son épaisseur (**Figure 9**).⁴¹

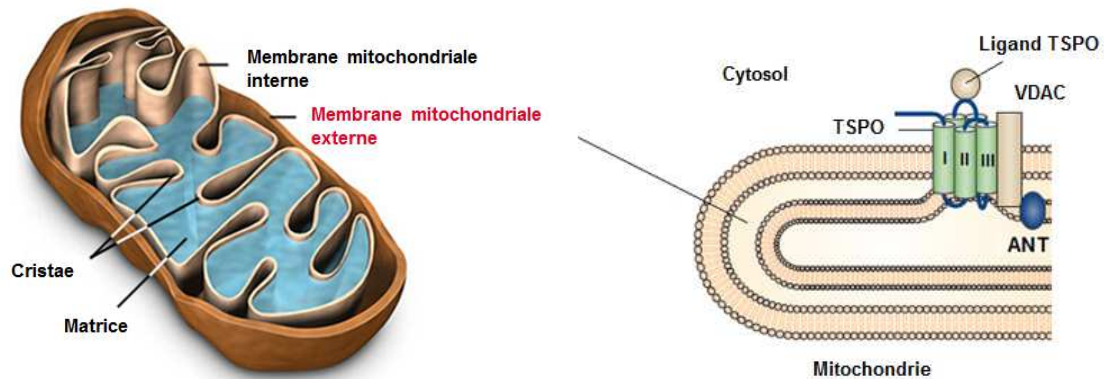


Figure 9. Structure de la mitochondrie et organisation spatiale du complexe trimérique.

1.2. Fonctions biologiques

Le complexe trimérique TSPO-VDAC-ANC est impliqué dans le pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTC) et joue un rôle important dans certains phénomènes de transport. En particulier, il contrôle la translocation du cholestérol du cytosol vers la membrane mitochondriale interne où il est oxydé par le cytochrome P450_{SCC} (SCC: Side-Chain Cleavage) en prégnénolone, un intermédiaire-clé de la biosynthèse stéroïdienne (**Schéma 15**).^{42,43} La protéine TSPO 18 kDa participe à d'autres phénomènes tels que l'homéostasie du calcium, la croissance des cellules et leur différenciation, la régulation de la réponse immunitaire (chemotaxie, apoptose) ainsi que dans le contrôle respiratoire mitochondrial.

³⁷ A. Beurdeley-Thomas, L. Miccoli, S. Oudard, B. Dutrillaux, M. F. Poupon. *J. Neurooncol.* **2000**, 46, 45.

³⁸ E. Joseph-Liauzun, P. Delmas, D. Shire, P. Ferrara. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2146.

³⁹ V. Papadopoulos, M. Baraldi, T. R. Guilarte, T. B. Knudsen, J.-J. Lacapere, P. Lindemann, M. D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M.-R. Zhang, M. Gavish. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 402.

⁴⁰ P. Casellas, S. Galiege, A. S. Basile. *Neurochem. Int.* **2002**, 40, 475.

⁴¹ E. Joseph-Liauzun, P. Delmas, D. Shire, P. Ferrara. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2146.

⁴² V. Papadopoulos, A. S. Brown. *J. Steroid Biochem.* **1995**, 53, 103.

⁴³ A. M. Scarf, L. M. Ittner, M. Kassiou. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 581.

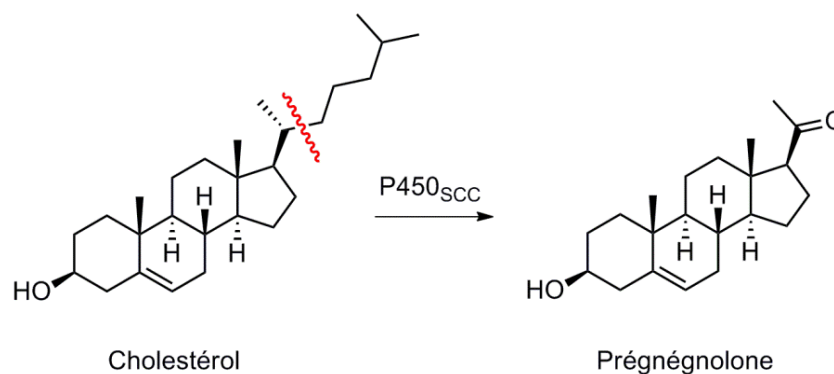


Schéma 15. Clivage oxydatif du cholestérol en prégnénone par le cytochrome P450_{SCC}.

1.3. Intérêt de la protéine TSPO 18 kDa en imagerie médicale

La protéine TSPO 18 kDa est directement impliquée dans la biosynthèse des stéroïdes. Alors que sa concentration est faible dans le système cérébral normal,⁴⁴ elle augmente considérablement dans des conditions inflammatoires. Cette surexpression, qui coïncide avec l'activation des cellules gliales, est particulièrement importante dans le cas de pathologies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.^{45,46,47} Ainsi, la protéine TSPO 18 kDa est aujourd'hui considérée comme un biomarqueur de ces maladies.⁴⁸ L'imagerie de la TSPO 18 kDa pourrait également être un moyen d'évaluer l'efficacité de traitements et de connaître l'évolution de la pathologie au cours du temps. Toutefois, pour y parvenir il est nécessaire de disposer de radioligands hautement sélectifs. Au cours des deux dernières décennies, une grande variété de molécules de plus en plus performantes ont été développées. Les résultats de ces recherches font l'objet de la seconde partie de ce chapitre.

2. Les radioligands de la protéine TSPO 18 kDa

2.1. Benzodiazépines

Les diazépines sont des molécules comportant un hétérocycle insaturé à sept atomes dont deux d'azote. Lorsque le cycle est fusionné à un noyau benzénique, on parle de benzodiazépines. Ces dernières forment une classe de médicaments psychotropes principalement utilisés pour soigner les troubles de l'anxiété (anxiolithiques). Le principal représentant de cette famille est le Diazépam, commercialisé depuis 1963 sous la marque Valium® par les laboratoires Roche. En 1989, Junck *et al.* ont essayé d'utiliser une benzodiazépine de structure très similaire au Diazépam, le 4'-chlorodiazépam marqué au carbone-11, [¹¹C]Ro5-4864 (**Figure 10**), pour

⁴⁴ M. Gavish, I. Bachman, R. Shoukrun, Y. Katz, L. Veenman, G. Weisinger, A. Weizman. *Pharmacol. Rev.* **1999**, 51, 629.

⁴⁵ J. J. Bourguignon. *Endogenous and synthetic ligands of mitochondrial benzodiazepine receptors: structure-affinity relationships*, *Peripheral Benzodiazepine Receptors*, Ed. E. Giensen-Crouse, Academic Press, **1993**, 59.

⁴⁶ H. Kettenmann, G. A. Burton, U. J. Moenning. *Neuroinflammation - from Bench to Bedside*, Ed. Ernst Schering Research Foundation, Springer, **2002**, 1-234.

⁴⁷ V. L. Raghavendra Rao, A. Dogan, K. K. Bowen, R. J. Dempsey. *Exp. Neurol.* **2000**, 161, 102.

⁴⁸ R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, T. C. Baghai, J. Fan, N. Akula, G. Groyer, D. Adams, M. Schumacher. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 971.

imager l'expression de la protéine TSPO 18 kDa dans un gliome humain car cette molécule avait donné de très bons résultats chez le rat.⁴⁹ Cependant, ils ne sont pas parvenus à observer d'accumulation du traceur dans les zones atteintes car il s'est avéré que l'affinité de Ro5-4864 envers TSPO 18 kDa variait beaucoup d'une espèce à une autre. Ainsi, des études génétiques ont démontré que Ro5-4864 se liait fortement à la protéine TSPO d'origine murine ($K_d = 1-9$ nM) ce qui n'était pas le cas chez l'Homme ($K_d = 54$ nM).⁵⁰

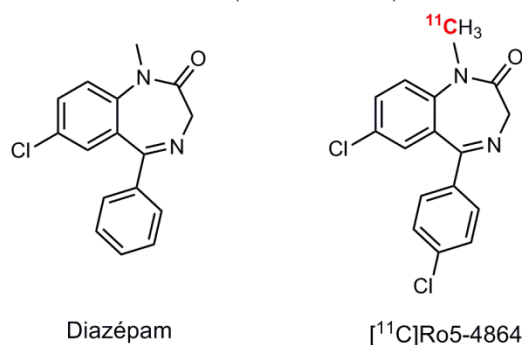


Figure 10. Structures des benzodiazépines Diazépam et [¹¹C]Ro5-4864.

2.2. Isoquinoléine carboxamides

Les isoquinoléine carboxamides constituent une autre famille de ligands de la TSPO 18 kDa dont le représentant principal est le PK11195 (**Figure 11**). Il a été démontré sur un modèle d'inflammation du rat que c'est l'énantiomère R qui est le plus sélectif envers la protéine TSPO.⁵¹ Le (*R*)-PK11195 a été radiomarké pour la première fois au carbone-11 en 1984 par Camsonne *et al.*⁵² et a depuis fait l'objet de nombreuses études, aussi bien sur des modèles animaux qu'en évaluation clinique. Il a ainsi été utilisé pour imager les tumeurs cérébrales, la sclérose multiple et certaines pathologies cardiaques.⁵³ Souvent considéré comme radiotraceur TEP de référence, le [¹¹C]PK11195 présente malgré tout certaines limitations telles qu'un contraste d'image peu élevé et une fixation non spécifique avec les protéines plasmatiques.⁵⁴ D'autres dérivés isoquinoléine carboxamides ont été développés depuis la découverte du PK11195 sans toutefois apporter d'améliorations significatives en termes de pharmacocinétique.⁵⁵ Il y avait donc un besoin en radiotraceurs plus performants ce qui s'est traduit par l'émergence de nouvelles classes de ligands de la TSPO.

⁴⁹ L. Junck, J. M. M. Olson, B. J. Ciliax, R. A. Koeppe, G. L. Watkins, S. Starosta-Rubinstein, W. R. Mancini, D. E. Kuhl, H. S. Greenberg, A. B. Young. *Ann. Neurol.* **1989**, 26, 752.

⁵⁰ R. Sprengel, P. Werner, P. H. Seeburg, A. G. Mukhin, M. R. Santi, D. R. Santi, D. R. Grayson, A. Guidotti, K. E. Krueger. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 20415.

⁵¹ F. Shah, S. P. Hume, V. W. Pike, S. Ashworth, J. McDermott. *Nucl. Med. Biol.* **1994**, 21, 573.

⁵² R. Camsonne, C. Crouzel, D. Comar, M. Mazière, C. Prenant, J. Sastre, M. Moulin, A. Syrota. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1984**, 21, 985.

⁵³ (a) V. W. Pike, C. Halldin, C. Crouzel, L. Barre, D. J. Nutt, S. Osman, F. Shah, D. R. Turton, S. L. Waters. *Nucl. Med. Biol.* **1993**, 20, 503 ; (b) L. Junck, J. M. Olson, B. J. Ciliax, R. A. Koeppe, G. L. Watkins, D. M. Jewett, P. E. McKeever, D. M. Wieland, M. R. Kilbourn, S. Starosta-Rubinstein, W. R. Mancini, D. E. Kuhl, H. S. Greenberg, A. B. Young. *Neurol.* **1989**, 26, 752 ; (c) S. Pappata, P. Cornu, Y. Samson, C. Prenant, J. Benavides, B. Scatton, C. Crouzel, J. J. Hauw, A. Syrota. *J. Nucl. Med.* **1991**, 32, 1608 ; (d) L. Junck, D. M. Jewett, M. R. Kilbourn, A. B. Young, D. E. Kuhl. *Neurology* **1990**, 40, 265 ; (e) P. Charbonneau, A. Syrota, C. Crouzel, J. M. Valois, C. Prenant, M. Crouzel. *Circulation* **1986**, 73, 476.

⁵⁴ S. Belloli, R. Moresco, M. Matarrese, G. Biella, F. Sanvito, P. Simonelli, E. Turolla, S. Olivieri, A. Cappelli, S. Vomero, M. Gallienle, F. Fazio. *Neurochem. Int.* **2004**, 44, 433.

⁵⁵ V. W. Pike, C. Halldin, C. Crouzel, L. Barre, D. J. Nutt, S. Osman, F. Shah, D. R. Turton, S. L. Waters. *Nucl. Med. Biol.* **1993**, 20, 503.

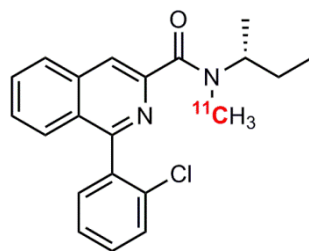


Figure 11. Structure de l'isoquinoléine carboxamide (R)-[^{11}C]PK11195.

2.3. Phénoxyaryl acétamides

L'optimisation des relations structure-activité de Ro5-4864 a conduit à l'ouverture du cycle diazépine et à la découverte en 1999 du [^{11}C]DAA1106, premier représentant de la classe des phénoxyaryl acétamides.⁵⁶ Ce ligand a été utilisé pour l'imagerie cérébrale *in vivo* chez la souris⁵⁷ et sur un modèle d'inflammation à l'acide kaïnique chez le rat.⁵⁸ Un analogue fluoré, le [^{18}F]FEDAA1106, a par la suite été synthétisé pour permettre des protocoles d'imagerie à la fois plus longs et plus complexes. [^{18}F]FEDAA1106 a été évalué avec succès chez le macaque rhésus en 2004⁵⁹ puis chez l'Homme en 2006.⁶⁰ Fujimura *et al.* ont démontré lors d'une étude clinique portant sur sept sujets masculins que le contraste de ce radioligand était plus élevé que celui du [^{11}C]PK11195 d'un facteur six. Toujours en 2006, un autre phénoxyaryl acétamide, le [^{11}C]DAA1097, a été radiomarké par la même équipe.⁶¹ Ce radioligand présentait une bonne aptitude à traverser la barrière hémato-encéphalique chez le rat et une accumulation dans le cortex occipital chez le singe sain.^{62,63} En 2005, Briard *et al.*⁶⁴ ont rapporté le radiomarkage du [^{11}C]PBR28, un analogue du [^{11}C]DAA1106 ayant démontré une spécificité envers la protéine de translocation chez le singe. Imaizumi *et al.*⁶⁵ ont par ailleurs mis en évidence la corrélation entre la biodistribution de ce radiotraceur et la densité en TSPO 18 kDa. En 2011, Damont *et al.* ont réalisé le radiomarkage d'une version fluorée, le [^{18}F]F-PBR28.⁶⁶ Parmi les autres ligands phénoxyaryl acétamides existants, on peut aussi citer [^{11}C]PBR01,⁶⁷ [^{18}F]PBR06⁶⁸ et [^{18}F]FEPPA.⁶⁹ Les structures des ligands phénoxyaryl acétamides décrits dans ce paragraphe sont représentées dans la **Figure 12**.

⁵⁶ S. Chaki, T. Funakoshi, R. Yoshikawa, S. Okuyama, T. Okubo, A. Nakazato, M. Nagamine, K. Tomisawa. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 371, 197.

⁵⁷ M.-R. Zhang, T. Kida, J. Noguchi, K. Furutsuka, J. Maeda, T. Suhara, K. Suzuki. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, 30, 513.

⁵⁸ J. Maeda, T. Suhara, M. R. Zhang, T. Okauchi, F. Yasuno, Y. Ikoma, M. Inaji, Y. Nagai, A. Takano, S. Obayashi, K. Suzuki. *Synapse* **2004**, 52, 283.

⁵⁹ M.-R. Zhang, J. Maeda, M. Ogawa, J. Noguchi, T. Ito, Y. Yoshida, T. Okauchi, S. Obayashi, T. Suhara, K. Suzuki. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2228.

⁶⁰ Y. Fujimura, Y. Ikoma, F. Yasuno, T. Suhara, M. Ota, R. Mtasumoto, S. Nozaki, A. Takano, J. Kosaka, M.-R. Zhang, R. Nakao, K. Suzuki, N. Kato, H. Ito. *J. Nucl. Med.* **2006**, 47, 43.

⁶¹ M.-R. Zhang, M. Ogawa, J. Maeda, T. Ito, J. Noguchi, K. Kumata, T. Okauchi, T. Suhara, K. Suzuki. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2735.

⁶² S. Okuyama, S. Chaki, R. Yoshikawa, S. Ogawa, Y. Suzuki, T. Okubo, A. Nakazato, M. Nagamine, K. Tomisawa. *Life Sci.* **1999**, 64, 1455.

⁶³ M. R. Zhang, M. Ogawa, J. Maeda, T. Ito, J. Noguchi, K. Kumata, T. Okauchi, T. Suhara, K. Suzuki. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2735.

⁶⁴ E. Briard, J. Hong, J. Musachio, S. S. Zoghbi, M. Fujita, M. Imaizumi, V. Cropley, R. Innis, V. Pike. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2005**, 48, S71.

⁶⁵ M. Imaizumi, E. Briard, S. S. Zoghbi, J. P. Gourley, J. Hong, Y. Fujimura, V. W. Pike, R. B. Innis, M. Fujita. *Neuroimage* **2008**, 39, 1289.

⁶⁶ A. Damont, R. Boisgard, B. Kuhnast, F. Lemée, G. Raggiri, A. M. Scarf, E. Da Pozzo, S. Selleri, C. Martini, B. Tavitian, M. Kassiou, F. Dollé. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 4819.

⁶⁷ M. Imaizumi, E. Briard, S. S. Zoghbi, J. P. Gourley, J. Hong, J. L. Musachio, R. Gladding, V. W. Pike, R. B. Innis, M. Fujita. *Synapse* **2007**, 61, 595.

⁶⁸ M. Wang, M. Gao, K. D. Miller, Q.-H. Zheng. *Steroids* **2011**, 76, 1331.

⁶⁹ A. A. Wilson, A. Garcia, J. Parkes, P. McCormick, K. A. Stephenson, S. Houle, N. Vasdev. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, 35, 305.

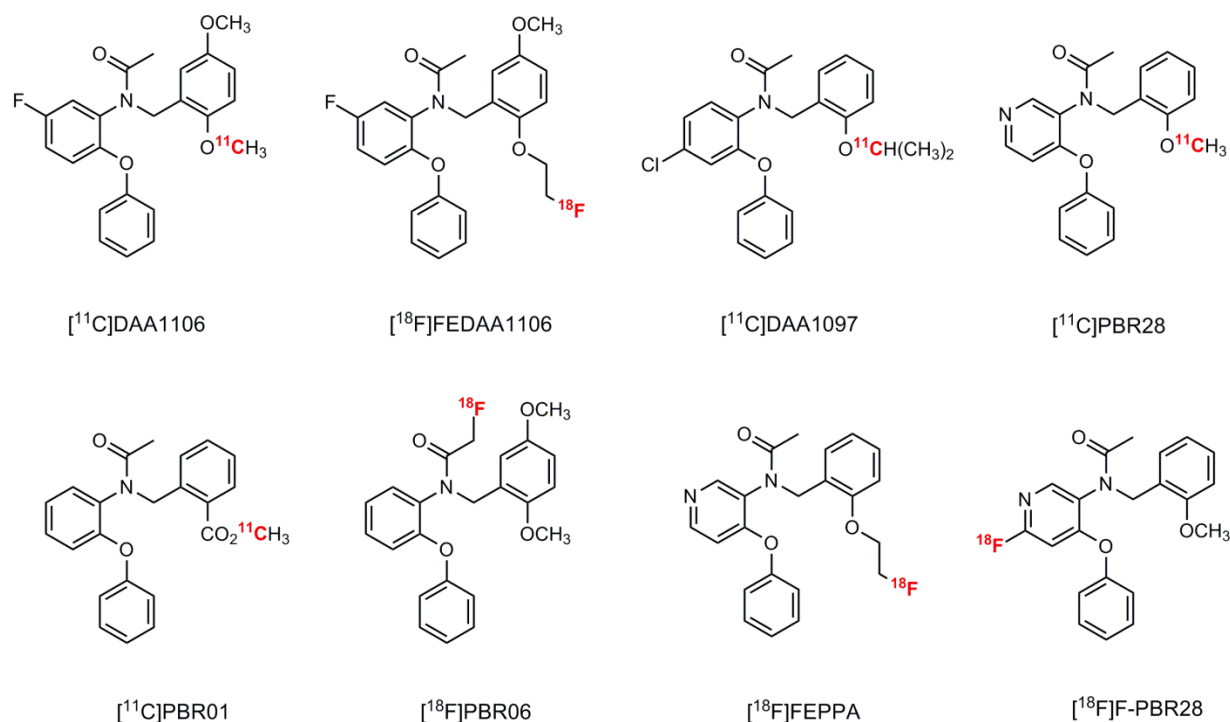


Figure 12. Structures de radioligands de la TSPO 18 kDa du type phénoxyaryl acétamide.

2.4. Alcaloïdes de Vinca

Les alcaloïdes de Vinca sont des substances naturelles produites par la pervenche de Madagascar, la dénomination « Vinca » venant du nom latin de la plante, *Vinca rosea*. Ils représentent une importante classe d'agents anticancéreux ciblant les microtubules (poison de fuseau). La vinpocétine (apovincaminat d'éthyle) est un alcaloïde de Vinca obtenu par hémisynthèse à partir de la vincamine (**Figure 13**). Elle possède des propriétés protectrices vis-à-vis de certaines maladies vasculaires cérébrales et est employée dans divers médicaments depuis 1978 comme le Cavinton®.⁷⁰ Elle a également été marquée au carbone-11 et employée en imagerie *in vivo* sur des singes cynomolgus par Gulyás *et al.*⁷¹ en 2005. Gulyás *et al.* ont démontré que la [¹¹C]vinpocétine franchissait rapidement la barrière hémato-encéphalique et s'accumulait après injection intraveineuse. Ainsi, 7,5 minutes après l'injection, les auteurs ont observé un pic d'accumulation représentant 5,90 % de la dose injectée alors qu'il représentait seulement 0,77 % pour le [¹¹C]PK11195.^{71,72,73} Gulyás *et al.* ont aussi mis en évidence le fait que la biodistribution de la [¹¹C]vinpocétine dans le cerveau était hétérogène avec une accumulation maximale dans le thalamus et les ganglions basaux.

⁷⁰ P. Bonoczk, B. Gulyás, V. Adam Vizi, A. Nemes, E. Karpati, B. Kiss. *Brain Res. Bull.* **2000**, 53, 245.

⁷¹ B. Gulyás, C. Halldin, A. Vas, R. B. Banati, E. Shchukin, S. Finnema, J. Tarkainen, K. Tihanyi, G. Szilagy, L. Farde. *J. Neur. Sci.* **2005**, 229, 219.

⁷² B. Gulyás, C. Halldin, P. Karlsson, Y.-H. Chou, C.-G. Swahn, P. Bonoczk. *J. Neuroimaging* **1999**, 9, 217.

⁷³ B. Gulyás, C. Halldin, J. Sandell, C.-G. Swahn, P. Bonoczk, B. Kiss. *Acta Neurol. Scand.* **2002**, 106, 325.

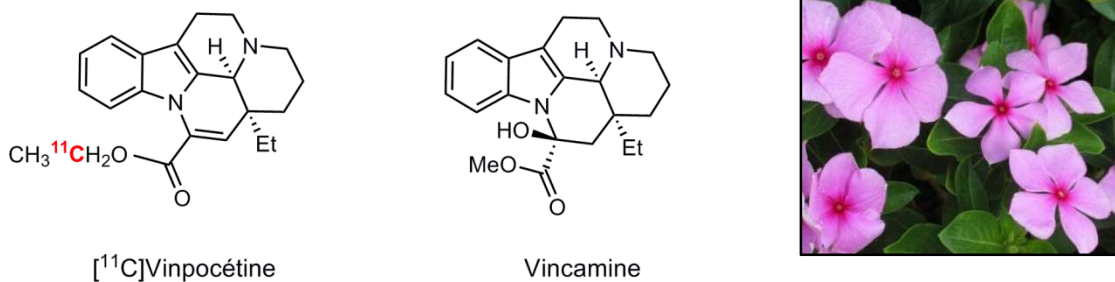


Figure 13. Structure de la $[^{11}\text{C}]$ vinpocétine et de la Vincamine ; pervenche de Madagascar (à droite).

2.5. Aryl-oxodihydropurines

Le $[^{11}\text{C}]$ AC-5216 (**Figure 14**) est un représentant de la famille des aryl-oxodihydropurines qui a été préparé et marqué par Zhang *et al.*⁷⁴ en 2007. Il présente une forte affinité pour la protéine TSPO 18 kDa comme l'ont démontré les expériences de déplacements faites avec le $[^3\text{H}]$ PK11195. Zhang *et al.* ont aussi mis en évidence que la radioactivité accumulée dans le cortex occipital du singe était de trois à quatre fois plus élevée qu'avec le $[^{11}\text{C}]$ PK11195, ce qui suggère une meilleure pénétration de la barrière hémato-encéphalique. Cela peut s'expliquer par la lipophilie de $[^{11}\text{C}]$ AC-5216, moins élevée que celle du $[^{11}\text{C}]$ PK11195, qui limite la fixation non spécifique aux protéines plasmatiques.

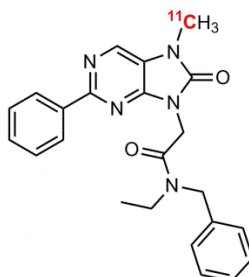


Figure 14. Structure de l'aryl-oxodihydropurine $[^{11}\text{C}]$ AC-5216.

2.6. Imidazopyridines et pyrazolopyrimidines

L'Alpidem est un anxiolytique à l'origine d'une classe de composés du type imidazo[1,2-*a*]pyridines (**Figure 15**). Il présente une forte affinité pour la protéine de translocation ($K_i = 0,5\text{--}7\text{ nM}$) mais aussi pour les récepteurs centraux aux benzodiazépines CBR ($K_i = 1\text{--}28\text{ nM}$), ce qui limite son intérêt.⁷⁵ D'autres imidazo[1,2-*a*]pyridines ont été développées, notamment

⁷⁴ M.-R. Zhang, K. Kumata, J. Maeda, K. Yanamoto, A. Hatori, M. Okada, M. Higuchi, S. Obayashi, T. Suhara, K. Suzuki. *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 1853.

⁷⁵ (a) E. Romeo, J. Auta, A. P. Kozikowski, D. Ma, V. Papadopoulos, G. Puia, E. Costa, A. Guidotti. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 262, 971 ; (b) A. P. Kozikowski, D. Ma, E. Romeo, J. Auta, V. Papadopoulos, G. Puia, E. Costa, A. Guidotti. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1060.

[¹¹C]CLINME^{76,77} et [¹⁸F]PBR111^{78,79} (**Figure 15**). Pour améliorer leur spécificité envers la protéine TSPO 18 kDa, diverses études de relations structure-activité du noyau imidazo[1,2-*a*]pyridine ont été menées.^{80,81,82,83} Ces recherches ont favorisé le développement de molécules bioisostères parmi lesquelles on distingue une classe particulièrement importante, celle des pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines (**Figure 15**).

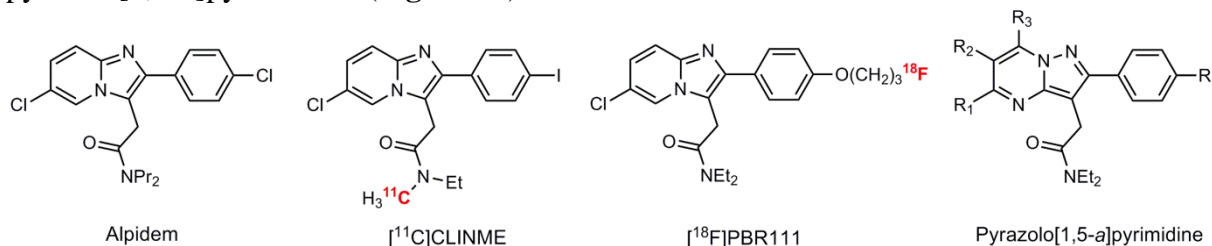


Figure 15. Structures des imidazo[1,2-*a*]pyridines Alpidem, [¹¹C]CLINME, [¹⁸F]PBR111 et du bioisostère pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine.

En 2001, Selleri *et al.*⁸⁰ ont publié un travail important sur le criblage d'une vingtaine de pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines pour parvenir à corrélérer la structure des molécules avec leur affinité envers la TSPO 18 kDa et les CBR. Dans leur travail, les auteurs n'ont pas modifié la fonction acétamide car des études avaient déjà montré que ce groupement était impliqué dans une liaison hydrogène déterminante pour sa fixation à la TSPO 18 kDa.⁸¹⁻⁸³ De même, il avait été rapporté que la modification de l'espacement du "bras" acétamide tendait à diminuer l'affinité.⁸⁴ Ainsi, Selleri *et al.* se sont focalisés sur l'influence des substituants en position 5 et 7 du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine et du groupement en *para* sur le cycle benzénique (**Figure 16**).

Dans leur étude, Selleri *et al.* ont mis en évidence que les substituants en position 5 et 7 affectaient non seulement l'affinité pour la TSPO 18 kDa mais également la sélectivité pour la TSPO vis-à-vis des CBR. Ainsi, le fait de placer un groupement méthyle en position 5 (ligand **II**) multipliait l'affinité pour TSPO par 57 par rapport à la molécule non méthylée (ligand **I**). Cela augmentait aussi l'affinité pour CBR d'un facteur 2,7. Cependant, lorsqu'un second groupement méthyle était incorporé en position 7 (ligand **III**), l'affinité pour TSPO devenait 130 fois plus élevée par rapport au ligand **I** et surtout, le ligand devenait spécifique de la TSPO 18 kDa puisque le $K_i(\text{CBR})$ observé était supérieur à 1 mM. Des variations autour du substituant en *para* sur le cycle benzénique ont permis à Selleri *et al.* d'augmenter encore un peu plus l'affinité en passant de 9,2 (R = H) à 1,4 nM (R = Cl). Les ligands **VI** (R = CH₃) et **V** (R = OCH₃) présentaient aussi une bonne affinité pour la protéine TSPO 18 kDa ($K_i = 1,7$ et 3,2 nM respectivement). Par rapport aux autres ligands, le composé **V** (R = OCH₃) présentait l'avantage

⁷⁶ C. Thominaux, F. Mattner, I. Greguric, H. Boutin, F. Chauveau, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, C. Loc'h, H. Valette, M. Bottlaender, P. Hantraye, B. Tavitian, A. Katsifis, F. Dollé. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, 50, 229.

⁷⁷ H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominaux, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, S. Jan, V. Brulon, Y. Fontyn, R. Trébessen, F. Dollé, B. Tavitian, A. Katsifis. *Glia*, **2007**, 55, 1459.

⁷⁸ N. Van Camp, R. Boisgard, B. Kuhnast, B. Thézé, T. Viel, M.-C. Grégoire, F. Chauveau, H. Boutin, A. Katsifis, F. Dollé, B. Tavitian. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2010**, 37, 962.

⁷⁹ F. Dollé, F. Hinnen, A. Damont, B. Kuhnast, C. Fookes, T. Pham, B. Tavitian, A. Katsifis. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, 51, 435.

⁸⁰ S. Selleri, F. Bruni, C. Costagli, A. Costanzo, G. Guerrini, G. Ciciani, B. Costa, C. Martini. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2661.

⁸¹ E. Romeo, J. Auta, A. P. Kozikowski, D. Ma, V. Papadopoulos, G. Puia, E. Costa, A. Guidotti. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 262, 971.

⁸² A. P. Kozikowski, D. Ma, J. Brewer, S. Sun, E. Costa, E. Romeo, A. J. Guidotti. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2908.

⁸³ M. Anzini, A. Cappelli, S. Vomero, G. Giorgi, T. Langer, G. Bruni, M. R. Romeo, A. S. Basile. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4275.

⁸⁴ G. Trapani, M. Franco, L. Ricciardi, A. Latrofa, G. Genchi, E. Sanna, F. Tuveri, E. Cagetti, G. Biggio, G. Liso, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3109.

de pouvoir être radiomarqué au carbone-11 par action de l'iodure de $[^{11}\text{C}]$ méthyle ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{-I}$) sur le dérivé phénol correspondant. Ainsi, en 2005, James *et al.* ont rapporté la radiosynthèse et les premières images TEP du $[^{11}\text{C}]\text{V}$ sous le nom de $[^{11}\text{C}]\text{DPA-713}$.⁸⁵

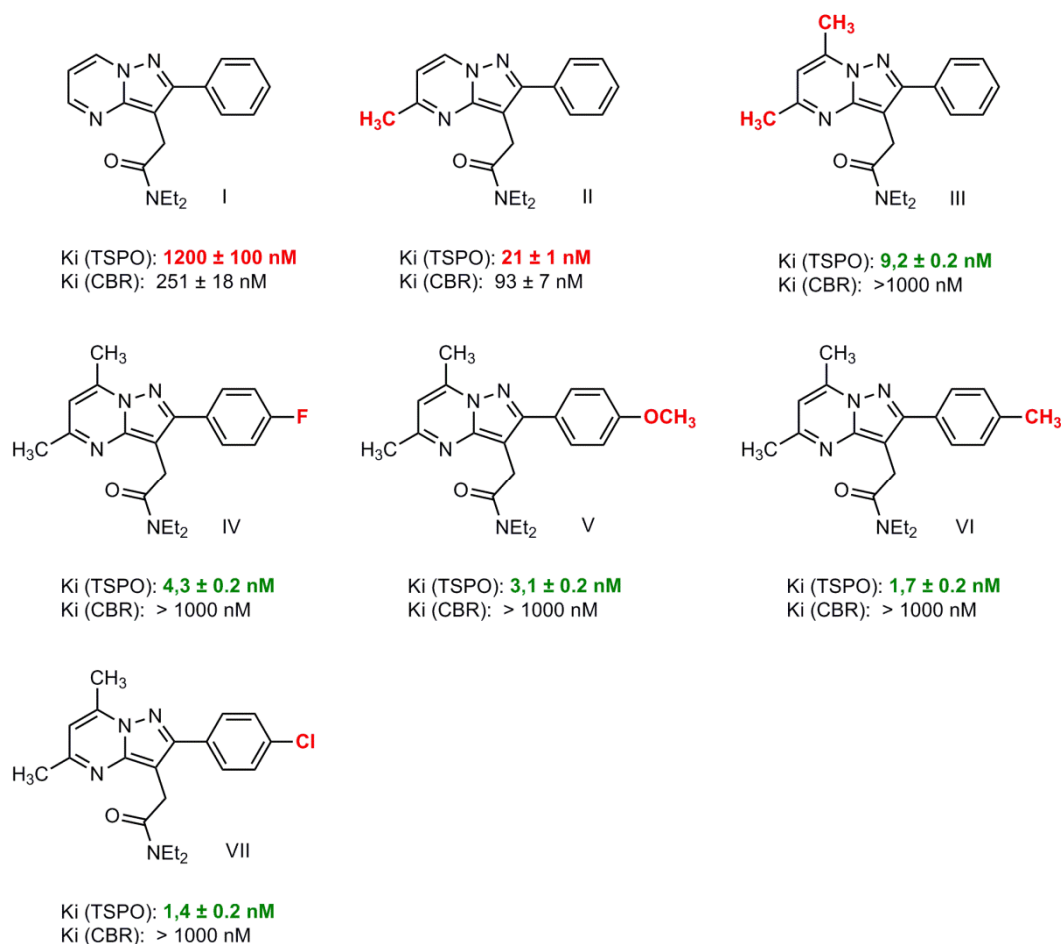


Figure 16. Variation de l'affinité des ligands pour la TSPO 18 kDa et les CBR en fonction des substituents en position 5, 7 et en *para* du noyau phényle.

Une version analogue marquée au fluor-18 est apparue dans la littérature en 2008, le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ (**Figure 17**, page suivante).^{86,87} Ces ligands ont constitué le point de départ de ce travail de thèse, c'est pourquoi ils seront abordés plus en détail dans le chapitre « projet de thèse ».

⁸⁵ M. L. James, R. R. Fulton, D. J. Henderson, S. Eberl, S. R. Meikle, S. Thomson, R. D. Allan, F. Dollé, M. J. Fulham, M. Kassiou. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 6188.

⁸⁶ M. L. James, R. R. Fulton, J. Vercouillie, D. J. Henderson, L. Garreau, S. Chalon, F. Dollé, B. Costa, D. Guilloteau, M. Kassiou. *J. Nucl. Med.* **2008**, 49, 814.

⁸⁷ A. Damont, F. Hinnen, B. Kuhnast, M.-A. Peyronneau, M. James, C. Luus, B. Tavitian, M. Kassiou, F. Dollé. *J. Label Compd. Radiopharm.* **2008**, 51, 286.

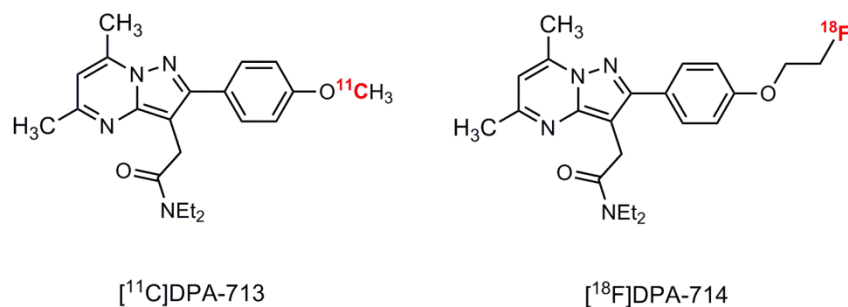


Figure 17. Structures de [¹¹C]DPA-713 et [¹⁸F]DPA-714, deux radioligands de la protéine TSPO 18 kDa.

2.7. Indole acétamides

Certains composés de type indole acétamides se sont avérés être d'excellents ligands de la TSPO 18 kDa. La classe des indole acétamides peut elle-même être subdivisée en deux sous-classes: les indole acétamides simples (un seul cycle indole) et les pyridazino[4,5-*b*]indole acétamides (cycles indole et pyridazine fusionnés). Parmi les indole acétamides, on trouve la série FGIN-1 qui rassemble des ligands ayant une affinité nanomolaire pour TSPO 18 kDa et présentant des propriétés anxiolytiques et anti-épileptiques. Dans cette série, le FGIN-1-27 est le ligand ayant la plus grande affinité pour la TSPO 18 kDa ($K_i = 5$ nM) (**Figure 18**).^{88,89} Dans la série pyridazino[4,5-*b*]indole acétamides, on retrouve le SSR180575 qui en est le représentant principal.^{90,91} Ce ligand présente une forte affinité pour la TSPO 18 kDa ($K_d = 3$ nM), aussi bien chez le rat que chez l'Homme, ainsi que des effets neuroprotecteurs. Les premières radiosynthèses de SSR180575 marqué au carbone-11 ont été rapportées par Thominaux *et al.*⁹² en 2010. Dans leur étude, la méthylation au carbone-11 est réalisée avec le triflate de [¹¹C]méthyle ([¹¹C]CH₃OTf) et permet d'obtenir [¹¹C]SSR180575 avec un rendement de 19 à 21 % (DCY) (**Figure 18**). [¹¹C]SSR180575 et des analogues fluorés font actuellement l'objet d'un dépôt de brevet et de développements en parallèle aux travaux décrits dans ce manuscrit.

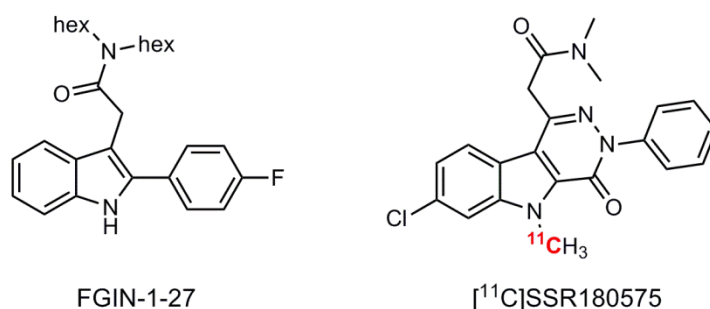


Figure 18. Structures des indole acétamides FGIN-1-27 et [¹¹C]SSR180575.

⁸⁸ E. Romeo, J. Auta, A. P. Kozikowski, D. Ma, V. Papadopoulos, G. Puia, E. Costa, A. Guidotti. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 262, 971.

⁸⁹ T. Opatz, D. Ferenc. *Org. Lett.* **2006**, 8, 4473.

⁹⁰ B. Ferzaz, E. Brault, G. Bourlaid, J.-P. Robert, G. Poughon, Y. Claustre, F. Marguet, P. Liere, M. Schumacher, J.-P. Nowicki, J. Fournier, B. Marabout, M. Sevrin, P. George, P. Soubrie, J. Benavides, B. Scatton. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 301, 1067.

⁹¹ F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, C. Thominaux, P. Hantraye, L. Rivron, F. Marguet, M.-N. Castel, T. Rooney, J. Benavides, F. Dollé, B. Tavitian. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2011**, 38, 509.

⁹² C. Thominaux, A. Damont, B. Kuhnast, S. Demphel, S. Le Helleix, S. Boissard, L. Rivron, F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, R. Boissard, S. Roy, J. Allen, T. Rooney, J. Benavides, P. Hantraye, B. Tavitian, F. Dollé. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, 53, 767.

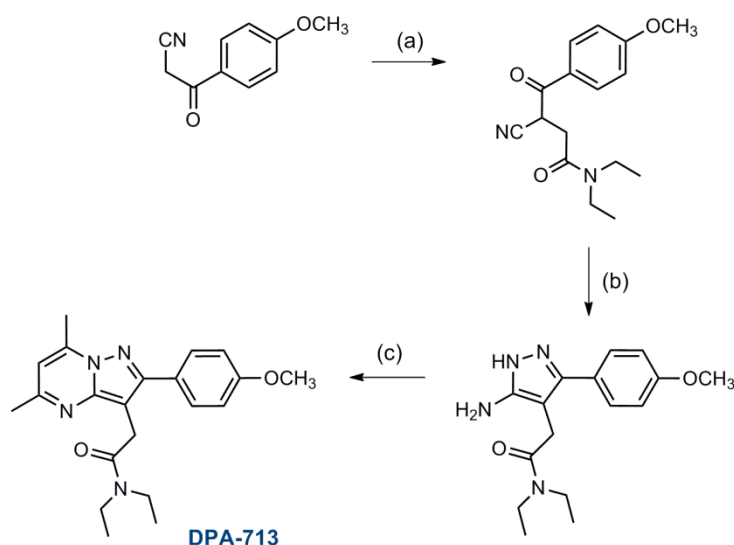
Chapitre 5: Le projet de thèse

1. Les ligands de la TSPO 18 kDa du type pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acétamides - Développements antérieurs

Le laboratoire s'investit depuis plusieurs années dans la recherche de nouveaux ligands de la TSPO 18 kDa et en particulier dans le développement de composés appartenant à la famille des pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acétamides.

Cette famille de ligands a émergé en 2001 après que l'étude de Selleri *et al.*⁸⁰ a laissé entrevoir le potentiel de ceux-ci en montrant que les pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acétamides disubstitués en position 5 et 7 par des groupements méthyle présentent une haute affinité et une excellente sélectivité pour la TSPO 18 kDa ($K_i < 5$ nM) (**Figure 16, section 2.6, chapitre 4**). A la suite de ces travaux, le composé DPA-713 (**Figure 18**) a reçu une attention particulière pour l'imagerie TEP de l'inflammation.

Concernant sa préparation, une première méthode en trois étapes a été développée par Selleri *et al.*⁸⁰ à partir d'un 1,3-cétonitrile commercial comme illustré dans le **Schéma 16**.



(a) *N,N*-diéthylchloroacétamide ; (b) hydrazine hydrate ; (c) acétylacetone.

Schéma 16. Méthode générale de synthèse de DPA-713 développée par Selleri *et al.*

La synthèse du dérivé phénolique, en tant que précurseur de marquage au carbone-11 par radiométhylation, a été préparé pour la première fois par James *et al.*⁸⁵ Ce composé a été obtenu en une étape chimique en chauffant simplement DPA-713 en présence de HBr comme exposé dans le **Schéma 17**. A noter que les mêmes auteurs ont également préparé DPA-713 en quatre étapes à partir du 4-hydroxybenzoate de méthyle.

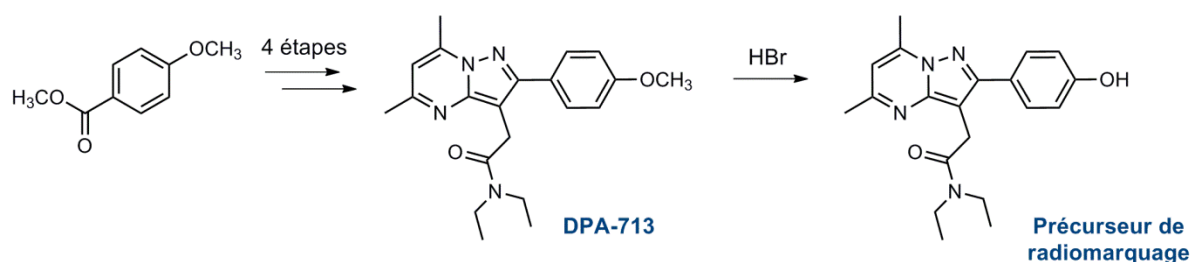


Schéma 17. Méthode de synthèse du précurseur de marquage de $[^{11}\text{C}]$ DPA-713 développée par James *et al.*

James *et al.* ont également réalisé le premier radiomarquage au carbone-11 de DPA-713 en méthylant le précurseur phénolique avec l'iodure de $[^{11}\text{C}]$ méthyle ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) comme illustré dans le **Schéma 18**.

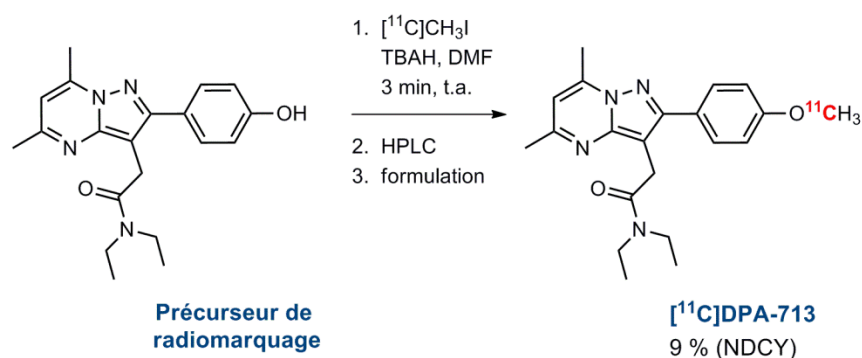


Schéma 18. Radiosynthèse de $[^{11}\text{C}]$ DPA-713 réalisée par James *et al.*

Les rendements radiochimiques obtenus en fin de synthèse étant relativement faibles, de l'ordre de 9 % (EOS), de meilleures conditions de radiomarquage ont été développées, notamment par Thominiaux *et al.*⁹³ Ces derniers sont parvenus à obtenir $[^{11}\text{C}]$ DPA-713 avec un rendement radiochimique compris entre 30 et 38 % (EOS), en employant le triflate de $[^{11}\text{C}]$ méthyle ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$).

Sur la base des propriétés intéressantes obtenues en imagerie avec $[^{11}\text{C}]$ DPA-713 (discutées ci-après), un dérivé fluoré, facilement marquable au fluor-18 et codé DPA-714, a rapidement été proposé. Ce ligand et son précurseur de radiomarquage ont été synthétisés pour la première fois par James *et al.*⁸⁶ en 2008 à partir du dérivé phénolique correspondant, comme présenté dans le **Schéma 19**.

Le marquage au fluor-18 de DPA-714 a également été décrit pour la première fois par James *et al.* puis repris et amélioré par Damont *et al.*⁸⁷ $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ a ainsi été obtenu avec un excellent rendement radiochimique, compris entre 50 et 70 % (DCY), par action de $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}$ dans le DMSO à 165 °C en présence du cryptant $\text{K}_{2.2.2}$ conformément au **Schéma 20**.

⁹³ C. Thominiaux, F. Dollé, M. L. James, Y. Bramoullé, H. Boutin, L. Besret, M.-C. Grégoire, H. Valette, M. Bottlaender, B. Tavitian, P. Hantraye, S. Selleri, M. Kassiou. *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, 64, 570.

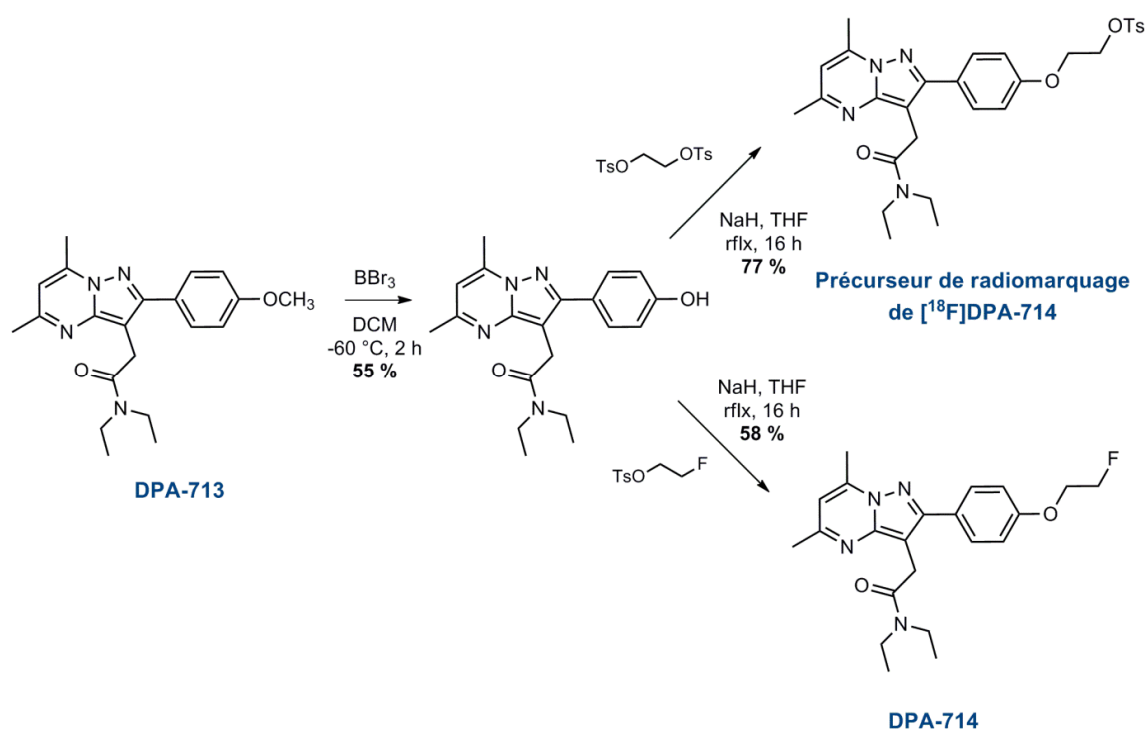


Schéma 19. Synthèse de DPA-714 et de son précurseur de radiomarquage au fluor-18.

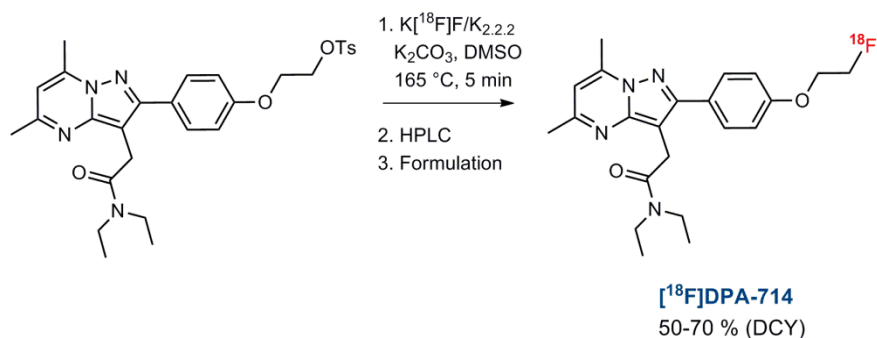


Schéma 20. Radiosynthèse de ^{18}F DPA-714.

Par la suite, des méthodes de synthèse améliorées de DPA-713 et de DPA-714 et de leurs précurseurs de radiomarquage respectifs ont vu le jour. Banister *et al.*⁹⁴ ont notamment développé une méthode de préparation sans purification chromatographique qui permet d'obtenir le précurseur de radiomarquage phénolique de DPA-713 avec un rendement global de 40 % sur six étapes. Tang *et al.*⁹⁵ ont également mis au point une méthode améliorée grâce à l'utilisation systématique de micro-ondes pour chaque étape de synthèse. Ceci leur a permis de réduire considérablement le temps de préparation du précurseur de radiomarquage de DPA-713, sans toutefois atteindre un rendement global de synthèse aussi élevé qu'avec la méthode de Banister *et al.* (21 % au lieu de 40 %).

⁹⁴ S. D. Banister, S. M. Wilkinson, R. Hanani, A. J. Reynolds, D. E. Hibbs, M. Kassiou. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 3780.

⁹⁵ D. Tang, J. R. Buck, M. R. Hight, H. C. Manning. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 4595.

En ce qui concerne l'imagerie TEP, plusieurs groupes de recherche ont étudié les propriétés de [^{11}C]DPA-713 et de [^{18}F]DPA-714 *in vivo*. En 2007, Boutin *et al.*⁹⁶ ont par exemple mis en évidence sur un modèle d'inflammation du rat (cerveau) que [^{11}C]DPA-713 permet d'obtenir une image TEP avec un meilleur rapport signal sur bruit que le ligand de référence [^{11}C]PK11195. En 2008, James *et al.*⁸⁷ ont évalué [^{11}C]DPA-713 chez le babouin sain. Ils ont démontré que [^{11}C]DPA-713 était spécifique de la TSPO 18 kDa et qu'il peut ainsi être utilisé pour étudier la répartition et la concentration de cette protéine dans le cerveau. En 2009, Chauveau *et al.*⁹⁷ ont réalisé la première étude comparative entre [^{11}C]DPA-713, [^{18}F]DPA-714 et [^{11}C]PK11195 sur un modèle de neuroinflammation aigue chez le rat, démontrant les propriétés supérieures en imagerie de [^{11}C]DPA-713 et [^{18}F]DPA-714, en comparaison à [^{11}C]PK11195. Toujours en 2009, Doorduyn *et al.*⁹⁸ ont réalisé une autre étude comparative chez le rat, avec ces mêmes radiotraceurs, mais sur un modèle d'Herpès Encephalitis. L'objectif de cette étude était d'évaluer ces ligands sur un modèle non invasif contrairement à la procédure habituelle qui nécessite une lésion excitotoxique du striatum au moyen d'agents chimiques (acide quinoléique, acide kaïnique). Enfin, toujours en 2009, Endres *et al.*⁹⁹ ont quant à eux rapporté la première utilisation de [^{11}C]DPA-713 chez l'Homme avec une étude portant sur sept sujets sains. Ils ont entre autre observé que la cinétique de distribution de [^{11}C]DPA-713 est plus rapide que celle de [^{11}C]PK11195.

2. Enjeux de la thèse

Bien que les traceurs [^{11}C]DPA-713 et [^{18}F]DPA-714 présentent tous deux une forte affinité pour la protéine TSPO 18 kDa, avec des K_i de respectivement $4,7 \pm 0,2$ nM et $7,0 \pm 0,4$ nM, leur développement en imagerie clinique est limité par différents facteurs. En ce qui concerne [^{11}C]DPA-713, la courte demi-vie du carbone-11 (20,4 minutes) restreint à la fois la durée de la radiosynthèse et celle de la session d'imagerie. [^{18}F]DPA-714 bénéficie quant à lui d'une plus grande facilité de production et d'utilisation du fait de la plus longue période du fluor-18 ($t_{1/2} = 109,8$ minutes). Néanmoins, comme démontré plus récemment, l'une des voies de métabolisation de [^{18}F]DPA-714 observée chez le rat et le babouin fait intervenir la perte de la chaîne [^{18}F]fluoroéthyle comme exposé dans le **Schéma 21**.¹⁰⁰

Cela est problématique dans la mesure où le métabolite radioactif issu de cette *O*-déalkylation conduit à l'apparition de [^{18}F]fluoroacétate dans l'organisme, un composé non spécifique de la protéine TSPO 18 kDa et cependant capable de traverser la barrière hémato-encéphalique *via* les transporteurs de monocarboxylate (MCT). Le [^{18}F]fluoroacétate contribue ainsi à augmenter le bruit de fond de l'image TEP du cerveau et à diminuer son contraste, défini comme le rapport

⁹⁶ H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominaux, M.-C. Grégoire, M. L. James, R. Trebossen, P. Hantraye, F. Dollé, B. Tavitian, M. Kassiou. *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 573.

⁹⁷ F. Chauveau, N. Van Camp, F. Dollé, B. Kuhnast, C. Thominaux, F. Hinnen, A. Damont, H. Boutin, M. L. James, M. Kassiou, B. Tavitian. *J. Nucl. Med.* **2009**, 50, 468.

⁹⁸ J. Doorduyn, H. C. Klein, R. A. Dierckx, M. James, M. Kassiou, E. F. J. De Vries. *Mol. Imag. Biol.* **2009**, 11, 386.

⁹⁹ C. J. Endres, M. G. Pomper, M. James, O. Uzuner, D. A. Hammoud, C. C. Watkins, A. Reynolds, J. Hilton, R. F. Dannals, M. Kassiou. *J. Nucl. Med.* **2009**, 50, 1276.

¹⁰⁰ M.-A. Peyronneau, W. Saba, S. Goutal, A. Damont, F. Dollé, M. Kassiou, M. Bottlaender, H. Valette. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, 41, 122.

du signal spécifique sur le bruit de fond. En d'autres termes, la *O*-déalkylation de [^{18}F]DPA-714 engendre une diminution de la qualité de l'image TEP pour la visualisation de la surexpression de la TSPO dans le cerveau.¹⁰¹ Il semblait donc judicieux de modifier la structure du DPA-714 de façon à limiter le processus de *O*-défluoroalkylation tout en conservant une forte affinité pour la protéine TSPO 18 kDa.

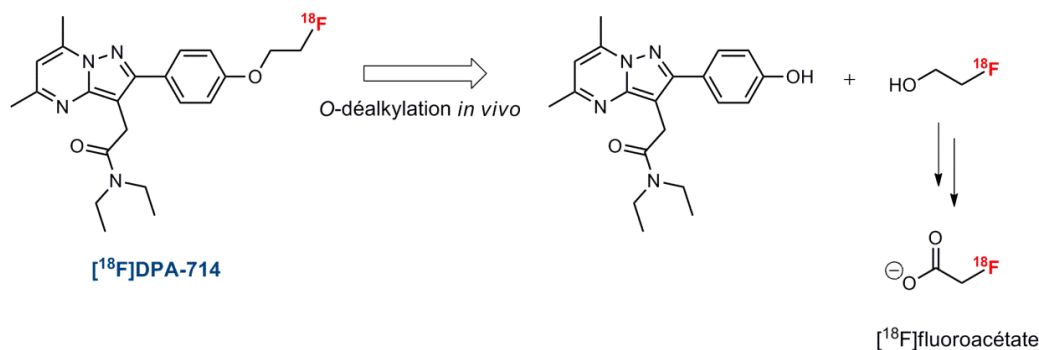


Schéma 21. Voie de métabolisation *in vivo* de [^{18}F]DPA-714 par *O*-déalkylation conduisant au radiométabolite interférant [^{18}F]fluoroacétate.

3. Le projet de thèse dans son ensemble

Le projet de thèse a fait intervenir séquentiellement quatre domaines d'activités:

- a) **La chimie organique de synthèse et la caractérisation physico-chimique** des molécules synthétisées qui constituent la majeure partie du travail présenté dans ce mémoire.
- b) **Les évaluations biologiques *in vitro*** (collaboration externe)
- c) **La radiochimie** (réalisée au SHFJ au sein de l'équipe)
- d) **Les évaluations par autoradiographie *in vitro* et imagerie TEP *in vivo*** (réalisées au SHFJ)

Coté chimie organique, le principal objectif a consisté à préparer des dérivés du DPA-714 plus résistants vis-à-vis de la défluorination *in vivo* afin d'éviter les effets néfastes de cette réaction sur la qualité des images TEP. Ce renforcement s'est fait au niveau de la chaîne fluorée latérale. En plus d'augmenter la stabilité, les modifications structurales envisagées ont eu pour finalité d'améliorer l'affinité des ligands pour la protéine TSPO 18 kDa. Les différents analogues ont été évalués *in vitro* afin de sélectionner les meilleurs candidats au radiomarquage. La radiochimie a, quant à elle, permis d'incorporer le fluor-18 par substitution nucléophile sur des précurseurs de radiomarquage adaptés afin d'obtenir les ligands radiofluorés visés. Enfin, les performances de ces radioligands, notamment en termes de contraste de l'image, de pharmacocinétique et de biodistribution, ont été évaluées en imagerie TEP.

¹⁰¹ M.-A. Peyronneau, A. Damont, H. Valette, W. Saba, J. Delforge, S. Goutal, S. Bourgeois, F. Hinnen, F. Dollé, M. Bottlaender. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2009**, 52, S385.

4. Structure du projet de recherche en chimie

Deux axes de recherches ont été envisagés pour développer des analogues de DPA-714 aux propriétés améliorées. Ces axes de recherche sont illustrés dans la **Figure 19** ci-après.

Axe de recherche 1: Dérivatisation de la chaîne latérale / diminution de la voie de métabolisation conduisant à la perte du fluor (incluant 4 sous-projets SP1 à SP4);

Axe de recherche 2: Dérivatisation de la fonction amide / optimisation de l'affinité.

Axe 1

- **SP1:** Analogues **alcanes**
- **SP2:** Analogues **alcynes**
- **SP3:** Analogues **alcènes**
- **SP4:** Analogue **phényle**

Axe 2

- **SP1:** Analogues **amides**

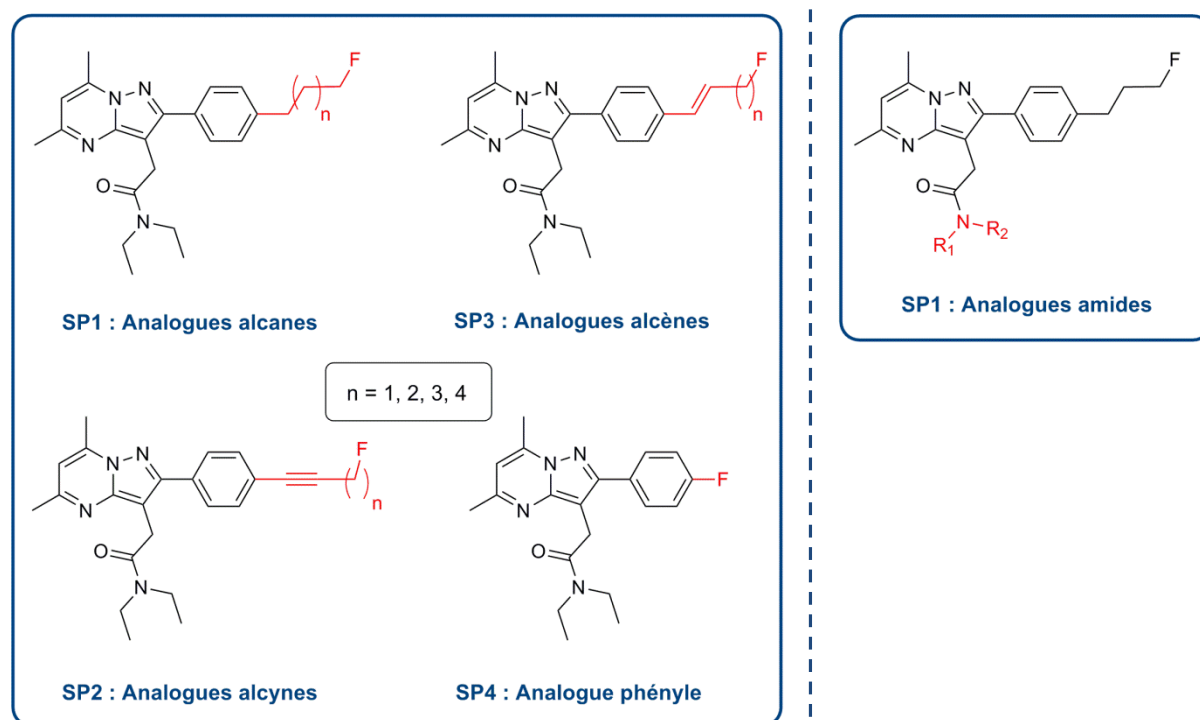


Figure 19. Structures des molécules-cibles des deux axes de recherche.

Le premier axe (**A1**) porte sur la modification de l'espaceur, c'est-à-dire de la chaîne hydrocarbonée reliant le cycle benzénique à l'atome de fluor, afin d'éviter la *O*-déalkylation. Pour cela, la modification la plus simple envisagée a été de remplacer l'atome d'oxygène de la chaîne fluoroéthoxy de DPA-714 par un atome de carbone, la liaison C-C étant énergétiquement plus stable. Selon ce principe, la synthèse d'une première série de quatre analogues "alcanes" (en référence à la chaîne carbonée saturée portant l'atome de fluor) a été envisagée dans le cadre du sous-projet 1 (**SP1**). L'influence de la lipophilie des molécules sur l'affinité pour la protéine

TSPO 18 kDa a été étudiée en faisant varier la longueur de la chaîne de trois (chaîne propyle) à six (chaîne hexyle) atomes de carbone. De la même façon, la synthèse d'analogues "alcynes" (sous-projet 2, **SP2**) et "alcènes" (sous-projet 3, **SP3**) a été envisagée, toujours en faisant varier la chaîne latérale de trois à six atomes de carbone, afin d'obtenir des ligands plus robustes *in vitro* et *in vivo*. Le quatrième sous-projet (**SP4**) consiste en la synthèse de l'analogue phényle dans lequel l'espaceur est supprimé et l'atome de fluor directement porté par le noyau benzénique en position *para*.

Le second axe de recherche (**A2**) a porté sur l'optimisation de la structure de l'analogue alcane à trois atomes de carbone (C3ane). Cette molécule a été choisie car elle présente un bon compromis entre robustesse, lipophilie, facilité de synthèse et affinité pour la protéine TSPO 18 kDa. L'optimisation a été envisagée par dérivatisation de la fonction amide, l'objectif étant de synthétiser une dizaine d'analogues amides disubstitués.

Deuxième partie

Résultats et discussion

Chapitre 1: Dérivés de DPA-714 modifiés en position *para* du noyau phényle

1. Analogues alcanes et alcynes

1.1. Cibles synthétiques

Les structures des analogues alcynes et alcanes visés sont rappelées dans la **Figure 20**. Au sein d'une même série, chaque analogue se distingue par la longueur de sa chaîne latérale qui varie de trois ($n = 1$) à six ($n = 3$) atomes de carbone. Chaque analogue a pour dénomination « Cxane » ou « Cxyne » selon qu'il s'agit respectivement d'un alcane ou d'un alcyne, « x » étant le nombre de carbone de la chaîne latérale. L'analogue alcyne à chaîne pentynyle par exemple ($n = 3$) est codé C5yne. Au total, quatre analogues alcanes et quatre analogues alcynes ont été visés.

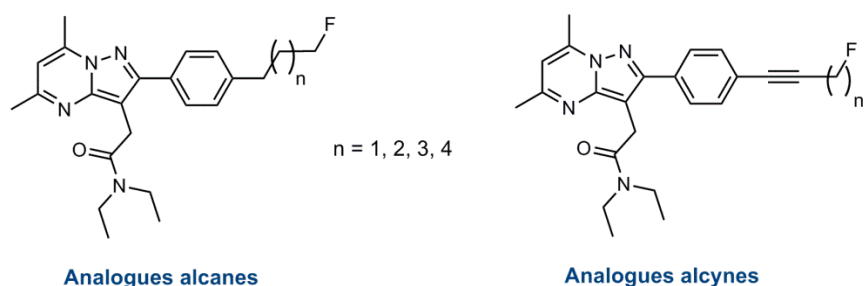


Figure 20. Structures des analogues alcanes et alcynes visés.

1.2. Première approche envisagée pour la synthèse des analogues C3ane et C3yne

1.2.1. Stratégie de synthèse

Une première voie de synthèse simultanée des analogues C3ane et C3yne a été envisagée à partir de la stratégie rétrosynthétique présentée dans le **Schéma 22**. Cette stratégie requiert le 4-iodobenzoate de méthyle comme produit de départ et fait apparaître comme 1^{ère} étape de synthèse un couplage de Sonogashira visant à fixer la chaîne alcyne propyn-3-ol sur le noyau benzénique de cet ester. S'en suit une réaction de cyanylation pour obtenir un 1,3-cétonitrile qui peut ensuite être alkylé en position α pour l'installation de la chaîne acétamide. Les deux cyclisations suivantes ont pour finalité la formation du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine. L'alcool propargylique résultant de ces transformations peut alors être soit directement fluoré pour donner l'analogue C3yne, soit hydrogéné pour réduire la triple liaison en liaison simple et ainsi obtenir la chaîne propyle avant la déhydroxyfluoruration finale dans le cas de l'analogue C3ane.

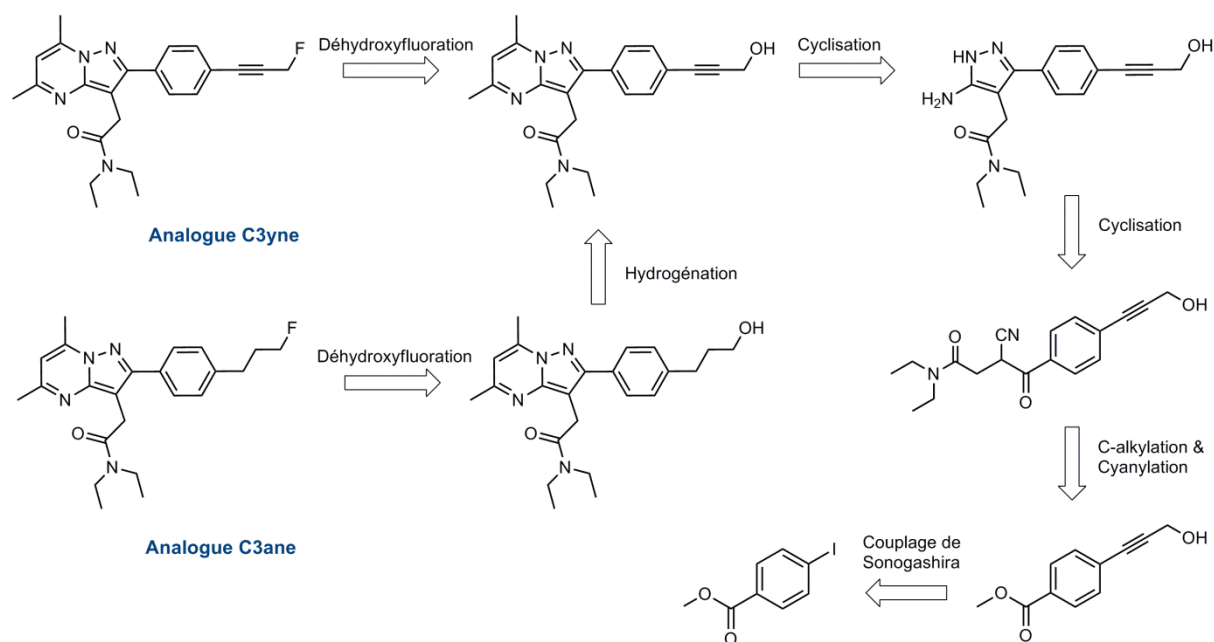
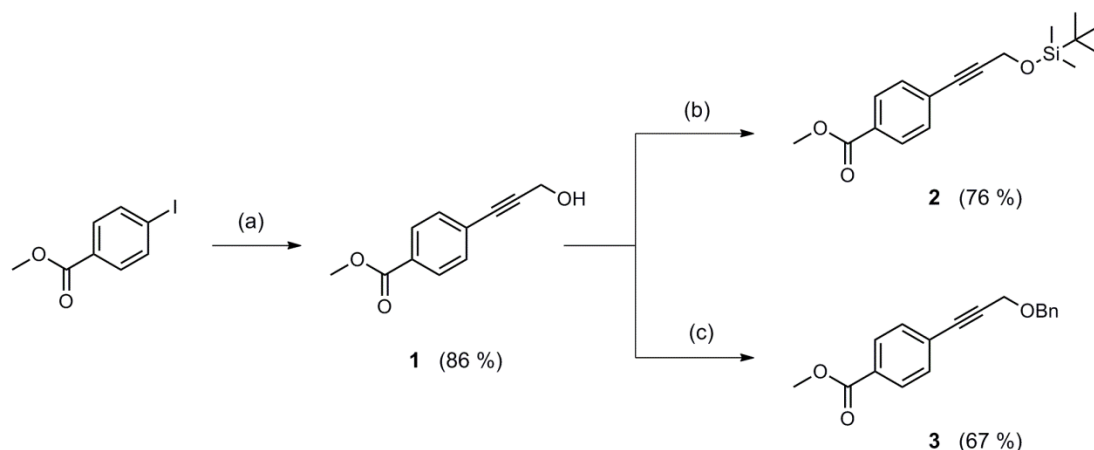


Schéma 22. Rétrosynthèse des analogues C3yne et C3ane.

1.2.2. Résultats obtenus pour la préparation des analogues C3yne et C3ane avec la première approche

1.2.2.1. Couplage de Sonogashira - Introduction du motif propargylique

Afin d'établir une preuve de concept, cette stratégie a d'abord été employée pour la synthèse de l'alcyne le plus simple, l'analogue C3yne, dont la chaîne latérale ne comporte que trois atomes de carbone. Dans la stratégie initiale, il était prévu d'introduire la chaîne alcyne avec sa fonction alcool terminale déjà protégée pour faciliter les étapes suivantes. Pour cela, un couplage de Sonogashira entre le 4-iodobenzoate de méthyle et le prop-2-yn-1-ol protégé par un groupement triméthylsilyl (TMS) a été réalisé. Cependant, il a été observé expérimentalement que le groupement TMS n'était pas suffisamment robuste et qu'il pouvait aisément être clivé pour donner l'alcool propargylique libre **1** (Schéma 23). Ainsi, il a rapidement été décidé d'effectuer dans un premier temps le couplage de Sonogashira avec un alcool libre puis de réaliser la protection en utilisant un groupement silylé moins labile tel que le *tert*-butyldiméthylsilyl (TBDMS). Le silyléther **2** a ainsi été obtenu avec un rendement satisfaisant par couplage de Sonogashira entre le 4-iodobenzoate de méthyle et le prop-2-yn-1-ol en présence de CuI et de Pd(PPh₃)₂Cl₂ (86 %) suivi d'une silylation avec le TBDMSCl dans la pyridine (76 %) à température ambiante. Le benzyléther **3**, encore plus robuste, a également été synthétisé par anticipation d'éventuels problèmes de décomposition du silyléther **2**. Il a été préparé avec un rendement de 67 % par alkylation au bromure de benzyle de l'alcoolate généré par action de NaH sur l'alcool **1** (Schéma 23).



Réactif et conditions : (a) prop-1-yn-2-ol, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, TEA, t.a., 7 j ; (b) TBDMSCl, Py, 0 °C, 3 h 30 ; (c) i. NaH, NaI, THF, 0 °C, 15 min - ii. BnBr, 0 °C à t.a., 8 h.

Schéma 23. Synthèses du silyléther **2** et du benzyléther **3**.

1.2.2.2. Cyanylation - 1^{ère} étape de la construction du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine

Une fois l'hydroxypropynyl benzoate protégé **2** obtenu, une réaction de cyanylation a été effectuée afin de substituer le groupement méthoxy de l'ester par un cyanométhylène et préparer la construction du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine. Le mécanisme réactionnel de cette réaction fait intervenir l'addition nucléophile du carbanion NCCH₂⁻, généré *in situ* par déprotonation de l'acétonitrile, sur le groupe carbonyle de l'ester. L'intermédiaire tétravalent se réarrange ensuite en rétablissant la double liaison du carbonyle et en éliminant un anion méthanolate. Ce réarrangement abouti à la formation d'un β-cétonitrile. L'anion méthanolate généré est alors capable de déprotoner le méthylène en position α du β-cétonitrile, comme présenté dans le **Schéma 24**. La formation de ce nouvel anion stabilisé par mésomérie empêche toute réversibilité de la réaction et constitue ainsi la force motrice assurant la conversion totale de l'ester de départ en β-cétonitrile.

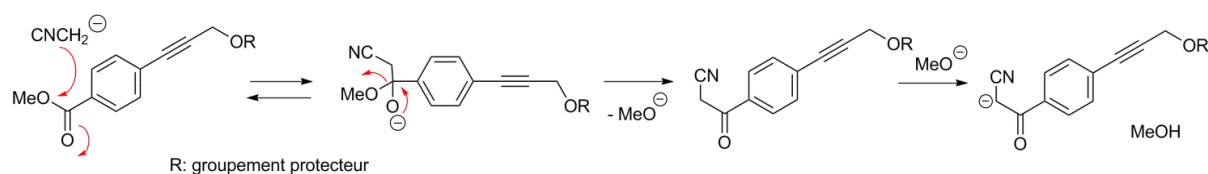


Schéma 24. Mécanisme de l'addition nucléophile du carbanion NCCH₂⁻ sur le groupement ester.

Deux procédures de cyanylation ont été testées: une méthode à chaud et une autre à basse température. La méthode à chaud consiste à faire réagir l'acétonitrile avec une base forte telle que le méthanolate de sodium en présence de l'ester. Cette réaction a été réalisée dans l'acétonitrile, qui joue à la fois le rôle de solvant et de réactif, avec NaOMe en large excès. L'équilibre NCCH₃ + B⁻ ⇌ NCCH₂⁻ + BH, même s'il est en défaveur de la formation du carbanion (pK_a de 25), permet néanmoins à la réaction de se faire du fait de l'irréversibilité du départ de l'ion méthanolate MeO⁻ après attaque nucléophile de NCCH₂⁻ sur l'ester. Ainsi, une

fois formé, le nitrile ne pouvant plus redonner l'ester de départ, il est possible d'obtenir une conversion totale de l'ester de départ pour un temps de réaction suffisamment long (10 h à 100 °C). Néanmoins, lorsque ces conditions ont été employées pour synthétiser le cétonitrile désiré à partir de l'ester **2**, des réactions secondaires ont été observées malgré les précautions usuelles employées (solvant anhydre, atmosphère d'argon, dégazage), résultant principalement de la saponification de l'ester. La stabilité du groupement TBDMS de **2** en milieu fortement basique peut également être en cause, c'est pourquoi le benzyléther **3** a été utilisé en remplacement. N'observant pas d'amélioration significative avec l'utilisation de **3**, une méthode « à froid » a été envisagée. Cette méthode consiste à faire réagir le *n*-butyllithium avec l'acétonitrile à -60 °C dans le THF puis à ajouter l'ester au milieu réactionnel. Contrairement à la méthode à chaud, l'acétonitrile et la base sont dans ce cas utilisés en quantités stoechiométriques, la réaction de déprotonation étant rapide et quantitative avec le *n*-BuLi, du fait de son pK_a très élevé (voisin de 40). La méthode à froid a ainsi permis d'obtenir le cétonitrile **4** avec un rendement de 87 %. De plus, aucune réaction secondaire n'a été observée avec cette méthode et le plus souvent la pureté du produit brut a été suffisante pour pouvoir l'engager directement dans la réaction suivante. Enfin, avec un temps de réaction divisé par plus de deux (4 h au lieu de 10 h), la méthode à froid a permis de gagner un temps appréciable (**Schéma 25**).

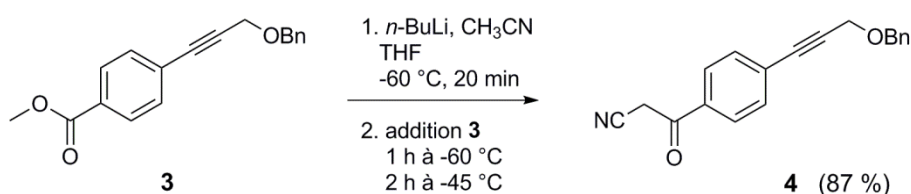


Schéma 25. Synthèse du 1,3-cétonitrile **4** à partir de l'ester méthylique **3**.

1.2.2.3. C-Alkylation - Introduction du motif *N,N*-diéthylacétamide

Les protons en α du 1,3-cétonitrile présentent un caractère acide marqué en raison de la forte stabilisation de la base conjuguée (énolate) dont la charge électronique peut se délocaliser par mésomérie sur cinq atomes et conduire à un intermédiaire entièrement conjugué (**Schéma 26**).

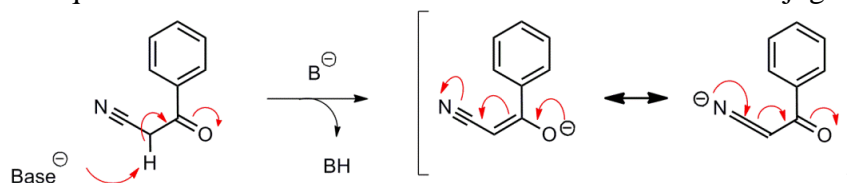


Schéma 26. Mésomérie de l'énolate issu du 1,3-cétonitrile **4**.

Ainsi, ces protons peuvent être facilement arrachés par une base de force moyenne. Cette propriété a été mise à profit pour fixer une chaîne diéthylacétamide sur le substrat. Pour cela, le 1,3-cétonitrile a d'abord été déprotoné par l'hydroxyde de sodium dans l'éthanol à température ambiante avant de réagir avec le *N,N*-diéthylchloroacétamide. Cette réaction nécessite généralement plusieurs jours pour atteindre une conversion acceptable mais il est possible de l'accélérer en rajoutant 2 eq de NaI (substitution *in situ* du chlore par l'iode). En

revanche, l'ajout d'un excès de base et/ou d'agent alkylant est à éviter au risque de former un produit dialkylé difficile à séparer du produit désiré. A noter également qu'il a parfois été difficile, voire impossible, de complètement séparer le produit désiré du *N,N*-diéthylchloroacétamide n'ayant pas réagi mais cela n'a pas été gênant pour la suite de la séquence réactionnelle. Dans ces conditions, l'acétamide **5** a été obtenu avec un rendement brut de 59 % et une pureté d'environ 80 % (**Schéma 27**).

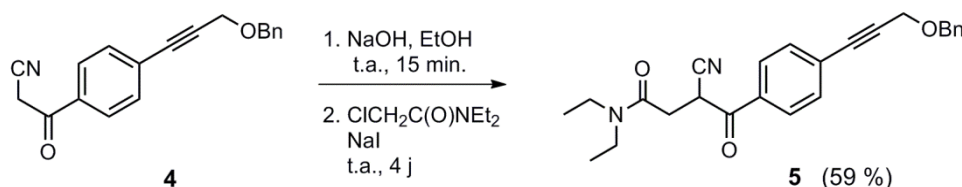


Schéma 27. Synthèse du nitrile acétamide **5** par C-alkylation du nitrile **4**.

1.2.2.4. Cyclisation I - Formation du cycle aminopyrazole

Pour la construction du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, le nitrile acétamide **5** a été engagé dans une réaction de cyclisation mettant en jeu de l'hydrazine monohydratée en présence d'acide acétique glacial (catalyseur) au reflux dans l'éthanol (**Schéma 28**). Le mécanisme réactionnel présenté dans le **Schéma 29** fait d'abord intervenir l'addition nucléophile de l'hydrazine sur le groupement carbonyle activé par la catalyse acide.

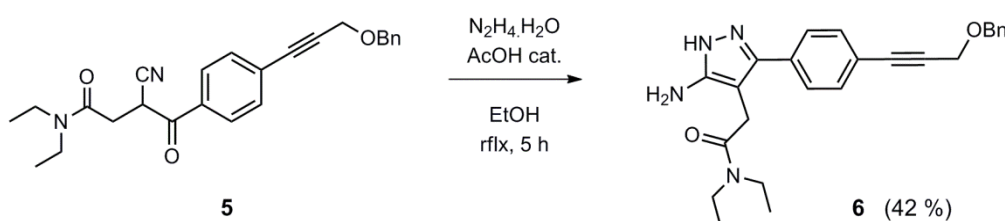


Schéma 28. Synthèse du pyrazole **6** à partir du nitrile acétamide **5**.

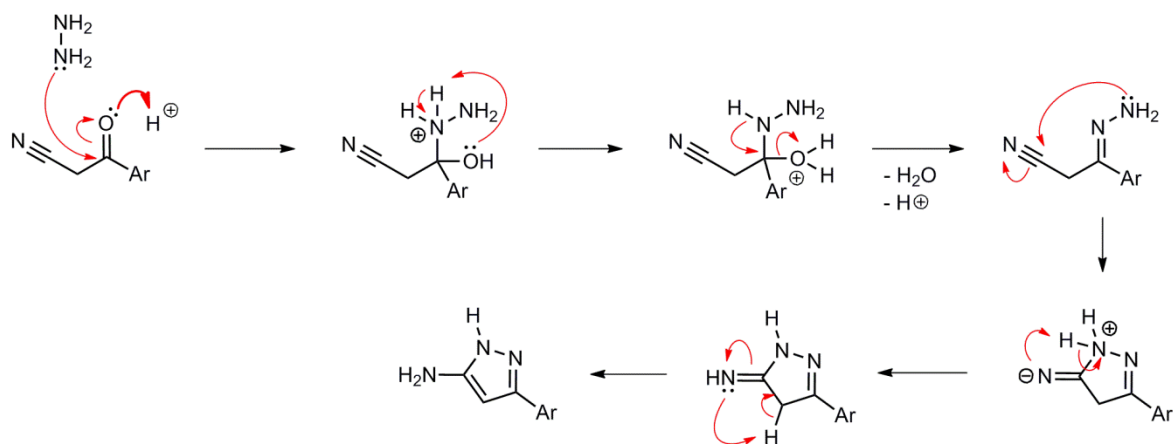


Schéma 29. Mécanisme proposé de formation du pyrazole **6**.

Après élimination d'une molécule d'eau et régénération du catalyseur, l'hydrazone intermédiaire s'additionne à son tour sur le carbone électrophile du groupement cyano, engendrant une cyclisation 5-*exo*-dig favorisée d'après les règles de Baldwin. Ensuite, l'intermédiaire subit une prototropie pour former une pyrimidoimine qui aboutit par tautomérisation au pyrazole 3,4,5-trisubstitué **6** qui a été obtenu expérimentalement avec un rendement de 42 %.

1.2.2.5. Cyclisation II - Formation du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine

Cette deuxième cyclisation peut être considérée comme l'étape-clé de la synthèse car elle donne accès au cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine. Elle a été remarquablement facile à mettre en œuvre puisqu'il suffit de mettre le pyrazole **6** en présence de 1,6 eq d'acétylacétone dans l'éthanol puis de chauffer au reflux pendant 10 h comme illustré dans le **Schéma 30**. Alors que la première cyclisation aboutissant au pyrazole **6** engendre de nombreux produits secondaires, celle-ci est très propre et sélective. À noter que la pyrazolopyrimidine **7** présente en CCM une intense fluorescence bleue sous la lampe UV à 365 nm qui est caractéristique de ce type de composés. Au niveau de l'extraction du produit, celui-ci cristallise très facilement une fois le milieu réactionnel revenu à température ambiante. Le volume d'éthanol à engager dans la réaction pour favoriser la cristallisation se situe entre 10 et 15 mL par gramme d'aminopyrazole **6**. Les cristaux sont alors isolés par filtration sur fritté et un simple lavage à l'éthanol glacé suffit pour obtenir la pyrazolopyrimidine **7** avec une pureté (≥ 95 %) et un rendement (73 %) tout-à-fait satisfaisants.

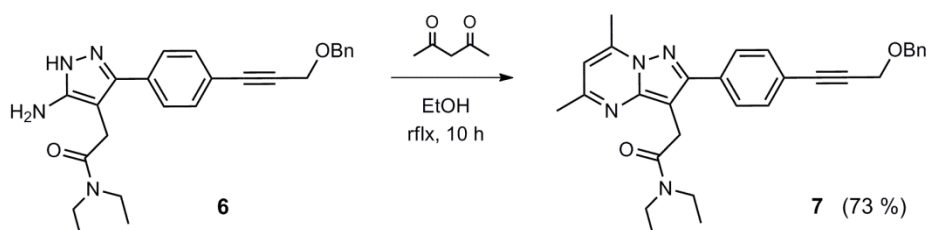


Schéma 30. Synthèse de la pyrazolopyrimidine **7** par cyclisation du pyrazole **6** avec l'acétylacétone.

1.2.2.6. Déprotection - Libération de l'alcool propargylique

L'étape de déprotection vise à cliver le groupement benzyle et à régénérer la fonction alcool du composé **7**. Dans la littérature, le clivage d'un groupement benzyle se fait le plus souvent par hydrogénolyse (H₂, Pd/C), par hydrolyse avec un acide fort ou de Lewis (HBr, BCl₃) ou par oxydation avec des benzoquinones de type DDQ. Dans le cas du benzyléther **7**, c'est la méthode par hydrolyse acide qui a été privilégiée car l'hydrogénolyse n'est pas compatible avec la présence de la triple liaison (réduction) et le DDQ est un réactif pouvant donner lieu à des

produits d'oxydation indésirables. La déprotection de l'éther **7** a ainsi été réalisée par action du trichlorure de bore BCl_3 à $-30\text{ }^\circ\text{C}$ dans le DCM comme présenté dans le **Schéma 31**.

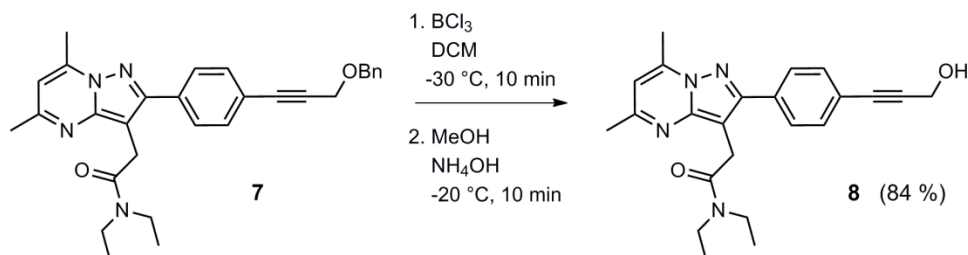


Schéma 31. Obtention de l'alcool **8** par déprotection du benzyléther **7** avec BCl_3 .

Le succès de cette réaction repose sur le mécanisme exposé dans le **Schéma 32**. Grâce à la forte affinité du bore pour l'oxygène, l'énergie de la liaison C-O est affaiblie, ce qui facilite l'attaque d'un ion chlorure sur la position benzylique. La liaison C-O est ensuite rompue et le groupement benzyle converti en chlorure de benzyle facilement éliminable par chromatographie. A l'issue de la débenzylation, un boronate est obtenu et l'alcool est régénéré par hydrolyse acide lors du traitement de la réaction. D'un point de vue expérimental, cette réaction a été assez rapide à mettre en œuvre mais il a été nécessaire de maintenir la température en dessous de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ sous peine de dégrader le produit. L'alcool **8** a été obtenu avec un rendement de 84 % après purification.

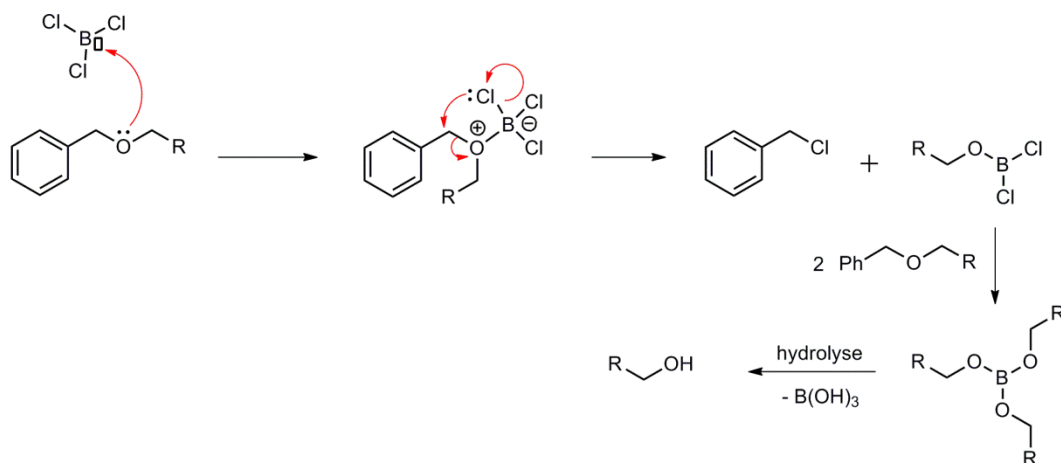


Schéma 32. Mécanisme général de clivage d'un benzyléther par BCl_3 .

1.2.2.7. Déhydroxyfluoruration - Introduction du fluor

La fluoruration de l'alcool **8** est la dernière étape de la stratégie de synthèse initiale et permet d'obtenir le motif fluoropropargylique. D'un point de vue général, la fluoruration d'un alcool peut se faire de deux façons différentes. La méthode la plus directe consiste à utiliser un agent de déhydroxyfluoruration qui active le groupement hydroxy et le remplace par un atome de fluor en une seule étape (procédure « one-pot »). Les réactifs les plus souvent employés pour ce type de

transformation sont le DAST (trifluorure de *N,N*-diéthylaminosulfure) et le Deoxofluor[®] (trifluorure de bis(2-méthoxyéthyl)aminosulfure). La seconde méthode d'obtention des dérivés fluorés est indirecte et fait intervenir deux étapes distinctes. Dans un premier temps, la fonction alcool est convertie en un sulfonate, le plus souvent un tosylate ou un triflate, de façon à générer un bon groupement partant. Le sulfonate est ensuite engagé dans la seconde étape, laquelle fait intervenir une source d'ions fluorures telle que le TBAF (fluorure de tétrabutylammonium) à chaud. En ce qui concerne la synthèse de l'analogue C3yne, le Deoxofluor[®] a été choisi en tant qu'agent de déhydroxyfluoruration car il est thermiquement plus stable que le DAST et moins dangereux à utiliser. Au cours de la réaction décrite dans le **Schéma 33**, l'analyse CCM du milieu réactionnel a révélé la présence de nombreux produits secondaires et ce, même en effectuant la déhydroxyfluoruration à basse température (-50 °C). Malgré de nombreuses tentatives, la chromatographie sur gel de silice n'a pas permis d'isoler le produit avec une pureté suffisante mais le massif caractéristique du motif CH₂F (doublet de triplet de constante J_{HF}^2 supérieure à 40 Hz) était clairement visible en RMN ¹H, preuve que la réaction fonctionne en partie. Dans l'hypothèse où le problème proviendrait de la trop grande réactivité du Deoxofluor[®], il a été envisagé de passer par un tosylate intermédiaire pour introduire le fluor par S_N2 mais là encore, de nombreux produits secondaires ont été observés lors de la tosylation ce qui suggère que c'est effectivement la réactivité particulière de l'alcool **8** qui est à mettre en cause. Pour cette raison, l'analogue C3yne a été préparé avec une autre méthode qui sera présentée plus loin dans le manuscrit (section 1.4.1).

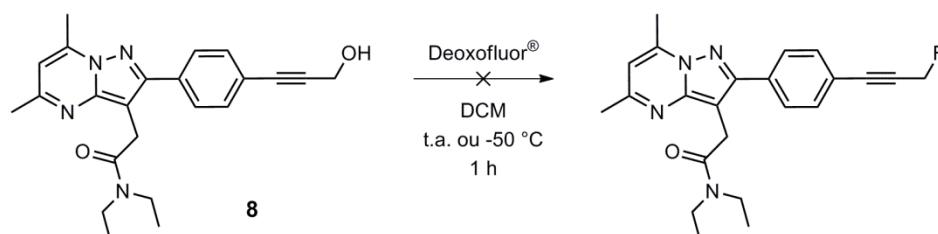
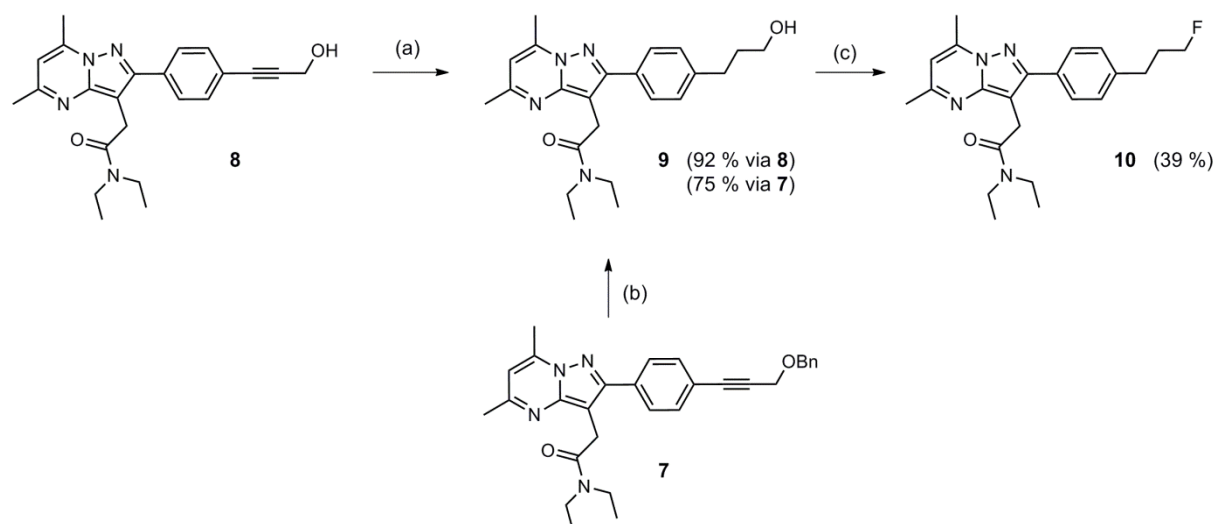


Schéma 33. Essai de déhydroxyfluoruration de l'alcool propargylique **8**.

1.2.2.8. Synthèse de l'analogue C3ane

Deux méthodes de synthèse de l'alcool saturé **9**, présentées dans le **Schéma 34**, ont été envisagées avant l'étape finale de déhydroxyfluoruration menant à l'analogue C3ane **10**. La première méthode fait intervenir l'alcool propargylique libre **8** et la deuxième met en jeu l'alcool propargylique protégé **7** qu'il est envisageable de débenzyler et de réduire en une seule étape.



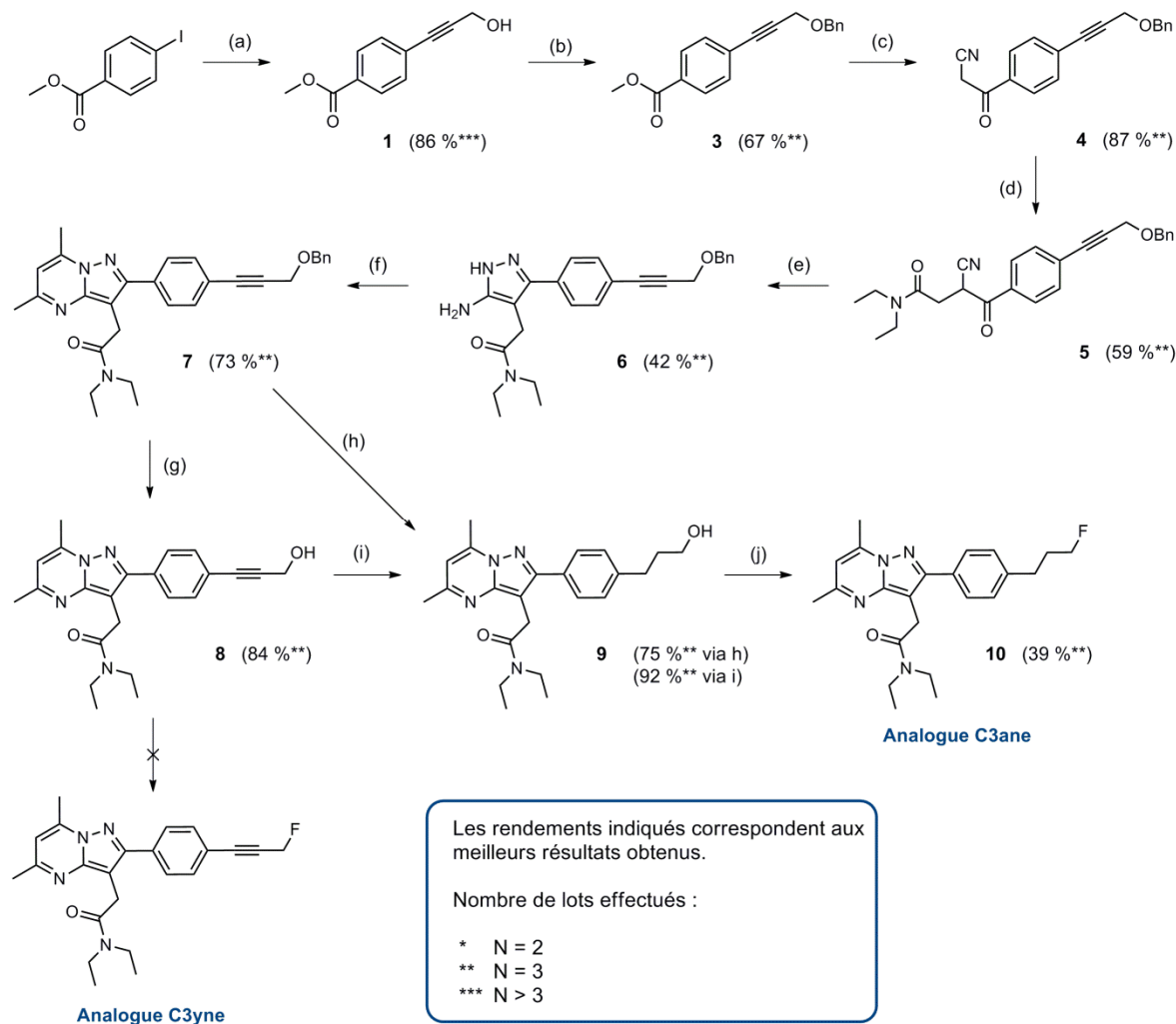
Réactifs et conditions : (a) H₂, Pd/C, DCM, t.a., 72 h ; (b) H₂, Pd/C, MeOH/DCM, t.a., 24 h ; (c) Deoxofluor[®], PhMe, t.a., 24 h.

Schéma 34. Accès à l'analogue C3ane **10** par deux voies différentes.

Dans la première méthode, l'alcool **9** a été directement obtenu par hydrogénation catalytique de l'alcyne **8** avec un excellent rendement de 92 % tandis que dans la deuxième, il a été préparé par hydrogénation de la triple liaison et hydrogénéolyse du groupement *O*-benzyle du benzyléther **7** avec un bon rendement de 75 %. La deuxième méthode présente l'avantage de faire gagner une étape sur la séquence réactionnelle globale par rapport à la première (8 étapes au lieu de 9). Elle paraît également plus élégante puisque le benzyléther **7** est hydrogéné et déprotégé en même temps. En réalité, les deux méthodes sont quasiment aussi performantes l'une que l'autre sur la base des rendements globaux obtenus, ceux-ci étant pratiquement identiques (77 et 75 %). Néanmoins, la deuxième méthode, celle passant par le benzyléther, semble être la plus intéressante d'un point de vue pratique car il n'y a qu'une seule réaction à mettre en œuvre. Une fois l'alcool **9** synthétisé, il a été fluoré avec le Deoxofluor[®] dans le toluène à t.a. avec un rendement de 39 %. Bien que ce rendement soit assez faible, aucune réaction secondaire n'a été observée au cours de cette déhydroxyfluoruration, contrairement à ce qui avait été observé avec l'alcool propargylique **8**.

1.2.3. Schéma de synthèse final de l'analogue C3ane **10**

Le schéma global de préparation de l'analogue C3ane **10** est présenté dans le **Schéma 35**. En résumé, cette première stratégie n'a pas permis de préparer l'analogue alcyne C3yne mais elle a été mise à profit avec succès pour la préparation de l'analogue C3ane **10** qui a ainsi été obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 3 %. Cependant, les difficultés associées à la synthèse de l'analogue C3yne et le manque de versatilité de cette première approche ont encouragé le développement d'une nouvelle stratégie à la fois plus souple et plus rapide pour l'obtention des autres analogues Cxane et Cxyne visés.



Réactifs et conditions: (a) prop-2-yn-1-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, t.a., 7 j ; (b) i. NaH, NaI, THF, 0 °C, 15 min - ii. BnBr, t.a., 8 h ; (c) i. *n*-BuLi, CH₃CN, -60 °C, 20 min - ii. addition ester **3**, 1 h, -60 °C, 2 h puis -45 °C ; (d) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, t.a., 4 j ; (e) N₂H₄·H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 5 h ; (f) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 10 h ; (g) i. BCl₃, DCM, -30 °C, 10 min - ii. MeOH, NH₄OH ; (h) H₂ 1 atm, Pd/C 10 %, MeOH/DCM, t.a., 24 h ; (i) H₂ 1 atm, Pd/C 10 %, DCM, t.a., 72 h ; (j) Deoxofluor®, DCM, t.a., 24 h.

Schéma 35. Séquence réactionnelle finale employée pour la synthèse de l'analogue C3ane (**10**).

1.3. Approche alternative pour la synthèse des autres analogues alcanes et alcynes

1.3.1. Stratégie de synthèse envisagée

Dans cette seconde stratégie, dont le schéma rétrosynthétique est présenté ci-dessous dans le **Schéma 36**, les analogues alcanes et alcynes sont préparés à partir d'un intermédiaire-commun iodé (I-DPA) produit en quatre étapes à partir du 4-iodobenzoate de méthyle. I-DPA est un « building block » possédant déjà le cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, la chaîne diéthylacétamide et un atome d'iode en position *para* du cycle benzénique permettant l'introduction de diverses chaînes latérales par des couplages de Sonogashira. Ainsi, cette seconde approche semble plus versatile que la première méthode dans la mesure où elle tire

parti des similitudes structurales existantes entre les analogues et qu'elle permet de se concentrer sur la dérivation de la chaîne latérale en fin de synthèse. En plus d'apporter de la souplesse à la synthèse, cette stratégie offre à priori un gain de temps appréciable en permettant une parallélisation des couplages de Sonogashira pour l'introduction des diverses chaînes latérales. Par ailleurs, le fait d'introduire ces chaînes en fin de séquence semble judicieux puisque cela permet de s'affranchir de la protection de la fonction alcool et ainsi d'alléger la synthèse de deux étapes (protection/déprotection). La séquence réactionnelle comporte ainsi quatre étapes communes aux analogues alcanes et alcynes, la dérivation finale se faisant après le couplage de Sonogashira.

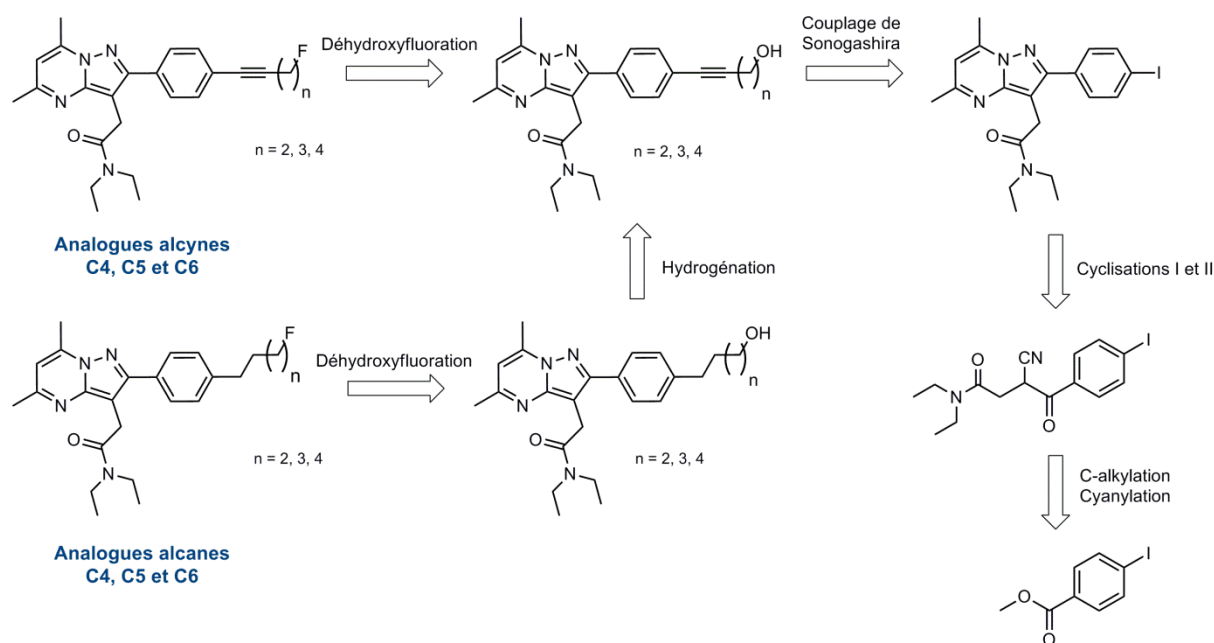


Schéma 36. Rétrosynthèse des analogues alcanes et alcynes avec l'approche alternative.

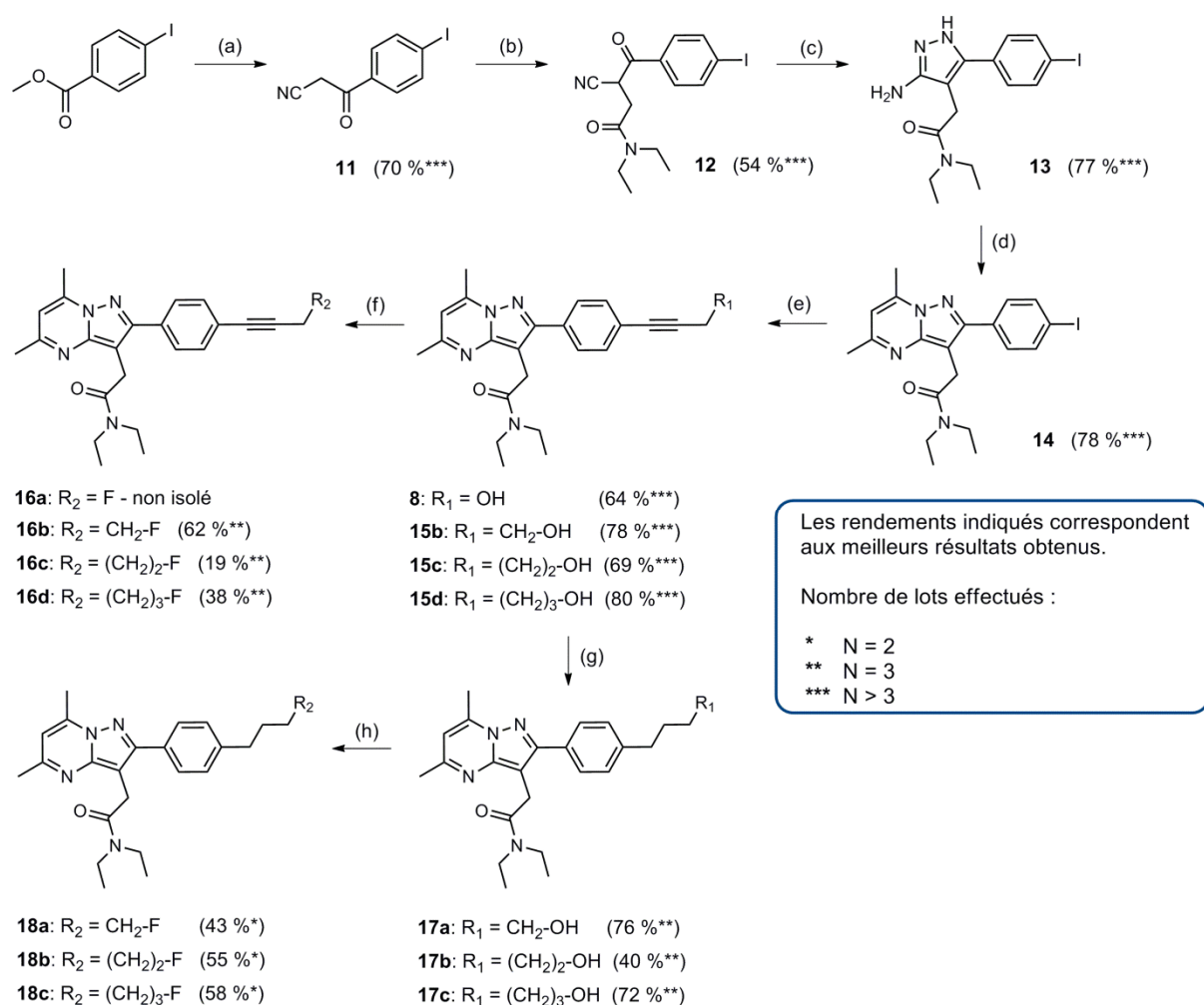
1.3.2. Résultats obtenus avec la deuxième stratégie de synthèse

La première étape de la séquence réactionnelle a consisté à cyanyler la fonction ester du 4-iodobenzoate de méthyle avec la méthode précédemment développée employant le *n*-BuLi à -60 °C. Cette réaction s'est bien déroulée puisque le 1,3-cétonitrile correspondant a été obtenu avec un rendement de 70 % et une pureté suffisante pour pouvoir l'engager directement dans la réaction suivante. Il a d'ailleurs été possible de travailler sur une échelle de 10-15 g d'ester par synthèse. En ce qui concerne la réaction de C-alkylation, elle a donné des résultats (rendement de 54 %) du même ordre de grandeur que ceux déjà obtenus pour la synthèse de l'analogue C3ane (59 %). En revanche, la cyclisation conduisant à l'iodopyrazole a mieux fonctionné que sur le benzyléther **5** (42 %) de la première séquence puisque le rendement a été de 77 %. La deuxième cyclisation, qui aboutit à la formation du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, a permis d'obtenir le « building-block » iodé I-DPA (**14**, **Schéma 37**) avec un bon rendement de 78 %. Cette réaction a été d'autant plus facile à mettre en oeuvre que I-DPA a cristallisé spontanément dans le milieu réactionnel ce qui a facilité son extraction et sa purification. Les couplages de Sonogashira engagés sur I-DPA ont permis d'obtenir les alcools insaturés C3, C4, C5 et C6

avec de bons rendements dans l'ensemble (64-80 %). Ces alcools ont ensuite été fluorés par le Deoxofluor® (sauf l'alcool C3 qu'il n'a pas été possible de fluorer directement) pour donner les analogues alcynes C4yne, C5yne et C6yne avec des rendements assez variables, compris entre 19 à 62 %. D'autres lots d'alcools insaturés C4, C5 et C6 ont été utilisés pour préparer les analogues alcanes. Pour cela, les triples liaisons ont d'abord été réduites par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C pour donner les alcools saturés avec des rendements moyens à bons (40-72 %). Ceux-ci ont finalement été fluorés par le Deoxofluor® pour donner les analogues alcanes C4ane, C5ane, C6ane avec des rendements corrects et plus homogènes qu'en série alcyne (43-58 %).

1.3.3. Schéma de synthèse final des analogues alcynes et alcanes C4, C5 et C6

Le schéma de synthèse global des analogues alcynes (**16b-d**) et alcanes (**18a-c**) avec la méthode alternative est décrit dans le **Schéma 37**.



Réactifs et conditions: (a) i. *n*-BuLi, CH₃CN, THF, -60 °C, 30 min - ii. 4-iodobenzoyl de méthyle, -60 °C, 1 h puis -45 °C, 2 h ; (b) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, t.a., 4 j ; (c) N₂H₄.H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 3 h ; (d) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 5 h ; (e) alkynol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, t.a., 24 h-72 h ; (f) Deoxofluor®, DCM, 2-4 j, t.a. ; (g) H₂ 1 atm, Pd/C 10 %, MeOH, 12 h-72 h, t.a. ; (h) Deoxofluor®, DCM, 24 h-48 h, t.a.

Schéma 37. Schéma de synthèse des analogues alcynes **16b-d** et alcanes **18a-c**.

1.3.4. Conclusion sur la synthèse des analogues alcynes et alcanes C4, C5 et C6 avec l'approche alternative

D'un point de vue général, la stratégie « I-DPA » s'est révélée beaucoup plus performante que la première méthode puisqu'elle a permis la synthèse en 7 étapes et en parallèle de trois analogues de la série alcane, C3ane **10** ayant déjà été préparé avec l'autre stratégie. Les rendements globaux sont relativement satisfaisants (5 % pour C4ane **18a**, 3 % pour C5ane **18b** et 8 % pour C6ane **18c**) en comparaison de ce qui a été obtenu avec la première méthode pour la synthèse de l'analogue C3ane **10** (3 %). Cela s'explique essentiellement par le fait que la séquence réactionnelle de la stratégie I-DPA comporte deux étapes en moins. Cette méthode a également permis de préparer en 6 étapes trois analogues alcynes (**16b-d**) sur les quatre de la série, là encore avec de bons rendements globaux, en particulier pour C4yne **16b** (11 %) et C6yne **16d** (7 %) contre 3 % pour l'analogue C3yne **16c**. Il est important de souligner que même si les rendements de déhydroxyfluoruration sont très variables, de 19 % pour l'analogue C5yne **16c** à 62 % pour le C6yne **16d**, les réactions sont toutes relativement propres (pas ou peu de produits secondaires), ce qui a permis l'obtention de produits ayant une pureté au moins égale à 95 % (RMN ^1H), condition indispensable pour pouvoir être évalués *in vitro*. En ce qui concerne l'analogue alcyne C3yne **16a**, étant donné qu'il n'a pas été possible de l'obtenir par déhydroxyfluoruration directe de l'alcool propargylique **8**, une stratégie de synthèse spécifique a été développée et sera présentée dans la section 1.4.1.

1.4. Synthèse de l'analogue alcyne C3yne

1.4.1. Stratégie de synthèse envisagée

Une stratégie en six étapes, basée sur la rétrosynthèse présentée dans le **Schéma 38**, a été développée exclusivement pour la préparation de l'analogue C3yne.

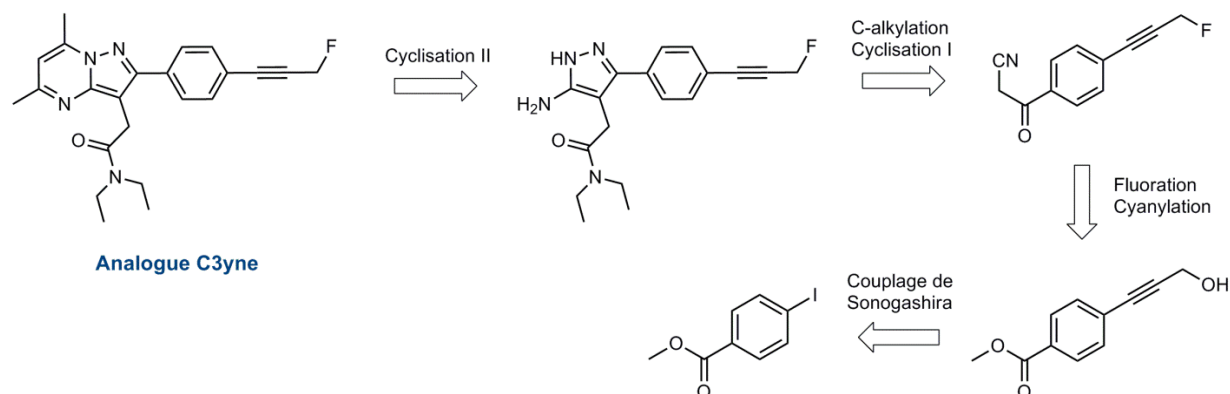
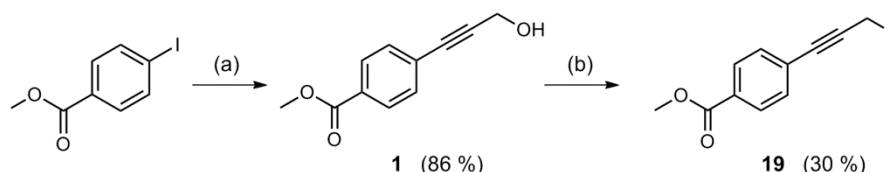


Schéma 38. Rétrosynthèse de l'analogue alcyne C3yne.

La principale amélioration a consisté à placer l'étape qui posait le plus de difficultés, à savoir la déhydroxyfluoruration, en début de séquence réactionnelle. De cette façon, il a été possible de compenser le faible rendement de déhydroxyfluoruration en engageant une quantité importante d'alcool propargylique rapidement accessible par couplage de Sonogashira avec le 4-iodobenzoate de méthyle commercial. Les quatre dernières étapes de la séquence permettent de former le cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine menant à l'analogue C3yne.

1.4.2. Résultats obtenus pour la synthèse de l'analogue C3yne

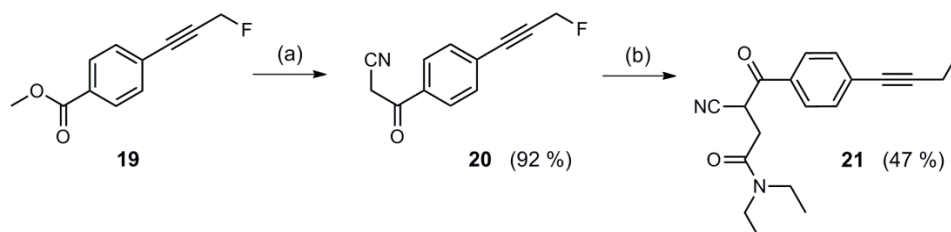
La synthèse de l'analogue C3yne a commencé par un couplage de Sonogashira entre le 4-iodobenzoate de méthyle et le prop-1-yn-3-ol qui a permis d'obtenir l'alcool propargylique **1** avec un bon rendement de 86 %. Celui-ci a ensuite subi une déhydroxyfluoruration par le Deoxofluor[®] dans le DCM pour donner le dérivé fluoropropynyle **19** avec un rendement de 30 % (**Schéma 39**).



Réactifs et conditions: (a) prop-2-yn-1-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, t.a., 7 j ; (b) Deoxofluor[®], DCM, t.a., 48 h.

Schéma 39. Schéma de synthèse du dérivé fluoropropynyle **19**.

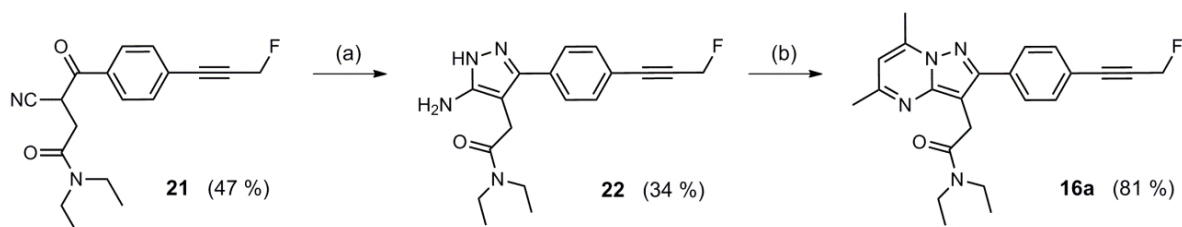
De nombreux produits secondaires ont été observés au cours de cette réaction, comme cela avait déjà été le cas pour l'alcool propargylique **8**, ce qui explique ce faible rendement. La réaction suivante a consisté à cyanyler la fonction ester de **19** par action de l'acétonitrile dans le *n*-BuLi à -60 °C comme présenté dans le **Schéma 40**. Cette réaction a été pratiquement quantitative avec un rendement de 92 %. Ainsi, il apparaît que cette méthode à froid est utilisable sur des structures relativement sensibles ce qui n'aurait sans doute pas été le cas avec la méthode à chaud utilisant NaOMe. Ensuite, l'étape de C-alkylation a permis d'incorporer la chaîne diéthylacétamide et d'obtenir le 1,3-cétonitrile acétamide **21** avec un rendement de 47 %.



Réactifs et conditions: (a) i. *n*-BuLi, CH₃CN, THF, -60 °C, 30 min - ii. **19**, -60 °C, 2 h ; (b) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, t.a., 4 j.

Schéma 40. Schéma de synthèse du 1,3-cétonitrile acétamide **21**.

La suite de la synthèse est décrite dans le **Schéma 41**. Lors de la première cyclisation, **21** a été mis en présence d'hydrazine et chauffé au reflux dans l'éthanol pour former l'aminopyrazole **22** avec un rendement de 34 %. La seconde cyclisation, dans laquelle **22** réagit avec l'acétylacétone également au reflux dans l'éthanol, a mieux fonctionné puisqu'elle a permis d'obtenir l'analogue C3yne, le dernier de la série alcyne, avec un rendement de 81 %.

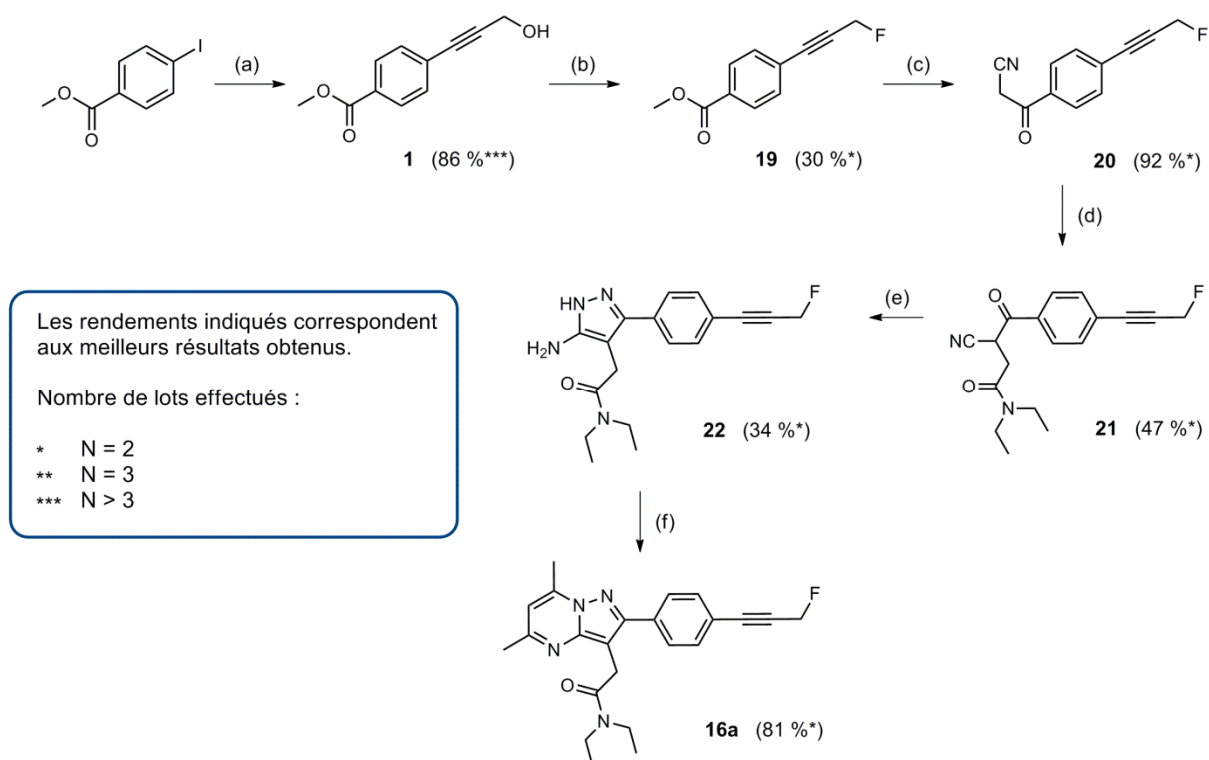


Réactifs et conditions: (a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 5 h ; (b) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 8 h.

Schéma 41. Schéma de synthèse de l'analogue C3yne **16a**.

1.4.3. Schéma de synthèse final de l'analogue C3yne

La séquence réactionnelle finalement utilisée pour préparer l'analogue C3yne **16a** est représentée dans le **Schéma 42**.



Réactifs et conditions: (a) prop-2-yn-1-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, t.a., 7 j ; (b) Deoxofluor[®], DCM, t.a., 48 h ; (c) i. *n*-BuLi, CH₃CN, THF, -60 °C, 30 min - ii. **19**, -60 °C, 2 h ; (d) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, t.a., 4 j ; (e) N₂H₄.H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 5 h ; (f) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 8 h.

Schéma 42. Schéma de synthèse final de l'analogue alcyne C3yne **16a**.

1.4.4. Conclusion sur la synthèse de l'analogue C3yne

Cette stratégie de synthèse alternative a permis de préparer l'analogue C3yne **16a** avec un rendement global de 3 %, ce qui est assez modeste pour une séquence de 6 étapes (**Schéma 42**). Cela s'explique par les mauvais résultats obtenus avec la déhydroxyfluoration (30 %) et la cyclisation I (34 %) qui ont significativement abaissé le rendement global (10 % sur ces 2 étapes). Cependant, le fait d'avoir judicieusement placé l'étape la plus limitante (déhydroxyfluoration) en début de synthèse a permis de s'affranchir d'une chute de rendement trop importante en fin de synthèse en produisant une quantité importante d'alcool (~ 40 g) par couplage de Sonogashira de l'ester de départ (commercial et bon marché). De cette façon, une quantité suffisante du dérivé fluoropropyne **19** a été produite pour pouvoir achever la synthèse dans son intégralité.

1.5. Cas de l'analogue alcane C2ane

Il a également été envisagé de préparer l'analogue C2ane afin de compléter la série alcane et d'affiner les modèles de relations structures-activités. L'analyse rétrosynthétique de ce composé est présentée dans le **Schéma 43**. Comme il n'est pas possible d'obtenir la chaîne éthyle à partir d'un alcyne, la stratégie par couplage de Sonogashira n'a pas pu être réutilisée pour cet analogue. Il a donc été envisagé d'utiliser un couplage de Stille sur I-DPA (**14**) pour incorporer un groupement vinyl sur le cycle benzénique. Celui-ci pourrait ensuite être fonctionnalisé en chaîne éthan-2-ol qui par déhydroxyfluoration permettrait d'obtenir l'analogue C2ane. En ce qui concerne l'obtention de la chaîne éthan-2-ol, deux approches ont été envisagées en partant du composé vinylique: par hydroboration oxydante (voie 1) ou par époxydation et hydrogénation (voie 2).

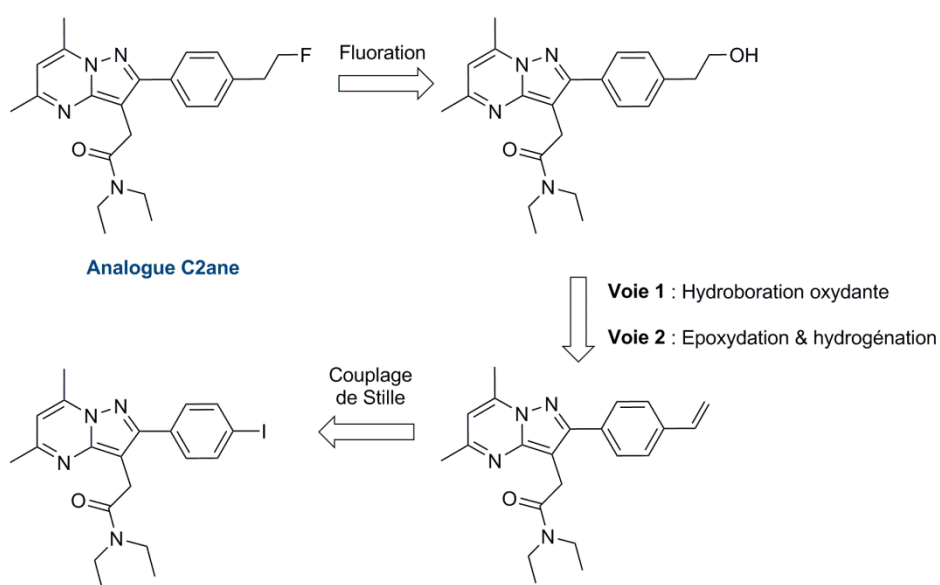


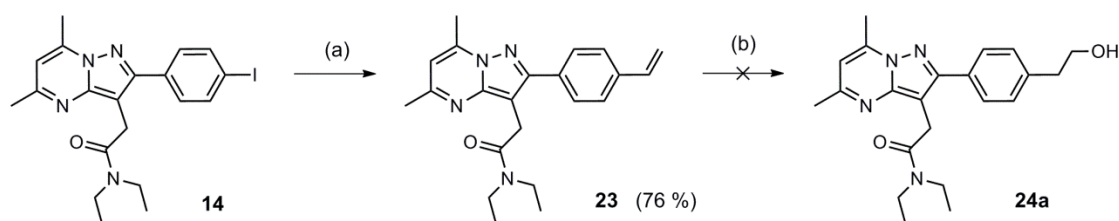
Schéma 43. Rétrosynthèse envisagée pour l'analogue C2ane.

1.5.1. Stratégie de synthèse par hydroboration oxydante

La stratégie par hydroboration oxydante commence par un couplage de Stille entre I-DPA (**14**) et un dérivé trialkylvinylétain visant à fixer le motif vinyle sur le noyau benzénique. Ensuite, la fonction alcène peut subir une hydroboration oxydante pour générer un alcool primaire terminal de manière régiosélective. La régiosélectivité de cette réaction est théoriquement régie par l'encombrement stérique du borane et seul le produit anti-Markovnikov, c'est-à-dire l'alcool le moins substitué, se forme. Par ordre de régiosélectivité croissante, on retrouve notamment le borane BH_3 , le siamylborane, le texylborane, les catécholboranes, les alpineboranes et le 9-BBNH. En ce qui concerne la synthèse de l'analogue C2ane, il a été prévu d'utiliser le 9-BBNH car il s'agit d'un borane commercial, stable et particulièrement régiosélectif.

1.5.2. Résultats de la stratégie de synthèse par hydroboration oxydante

Le couplage de Stille entre I-DPA (**14**) et le vinyltributylétain en présence de LiCl et de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ dans le DMF à t.a. pendant 48 h a permis de préparer le dérivé vinylique **23** (vinyl-DPA) avec un rendement de 76 %. Ainsi, même si ces conditions opératoires, inspirées des travaux de Chan *et al*, étaient originalement décrites pour le couplage d'aryltriflates avec des dérivés vinylétain,¹⁰² il a été possible d'obtenir de très bons résultats avec l'iodoaryl I-DPA (**14**) comme présenté dans le **Schéma 44**. Une fois le vinyl-DPA **23** isolé, une tentative d'hydroboration oxydante avec le 9-BBNH a été entreprise. Cependant, aucune réaction n'a été observée après 6 h de réaction avec 3 eq de 9-BBNH dans le THF à t.a. suivi d'une hydrolyse avec $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$.



Réactifs et conditions: (a) tributylvinylétain, LiCl, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, DMF, t.a., 48 h ; (b) i. 9-BBNH, THF, 0 °C, 15 min puis t.a., 6 h - ii. NaOH, H_2O_2 , 0 °C puis t.a. (pas de réaction).

Schéma 44. Essai de synthèse de l'alcool **24a** par utilisation du 9-BBNH.

Un essai a également été réalisé à chaud en faisant réagir le composé vinyl-DPA (**23**) avec du 9-BBNH dans le THF au reflux mais il s'est révélé infructueux. Cela pourrait être dû à un manque de réactivité de l'alcène **23**. En particulier, il est possible que la liaison π soit appauvrie en électrons du fait de sa conjugaison avec le noyau benzénique lui-même désactivé par le cycle pyrazole. L'encombrement stérique de l'alcène **23** pourrait également être en cause. Toutefois,

¹⁰² W. K. Chan, F.-C. Huang, M. M. Morrisette, J. D. Warus, K. J. Moriarty, R. A. Galemme, W. D. Dankulich, G. Poli, C. A. Sutherland. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3756.

le fait que Wender *et al.* soient parvenus à hydroborer dans les mêmes conditions¹⁰³ une oléfine vinylique nettement plus encombrée que **23** (Schéma 45) tend à confirmer la première hypothèse.

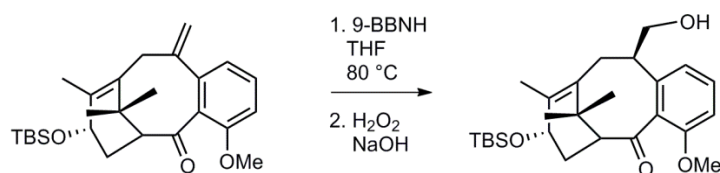
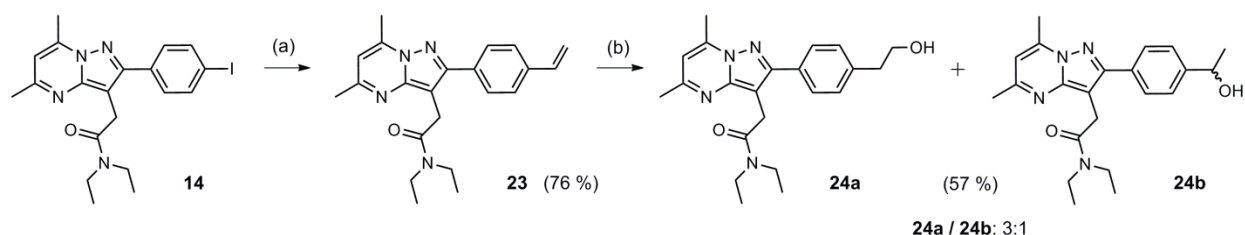


Schéma 45. Réaction d'hydroboration oxydante réalisée par Wender *et al.*

Pour parvenir à hydroborer le composé vinyl-DPA (**23**), un essai a été réalisé en faisant agir le complexe $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ pendant 12 h à t.a. puis en hydrolysant le milieu réactionnel avec $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$. Même si le rendement brut a été de seulement 57 %, la réaction a été totale et rapide. Cependant, un mélange de régioisomères (identifiés en RMN ^1H et non distinguables en CCM), constitué de 3/4 de l'alcool désiré **24a** et de 1/4 de l'alcool secondaire **24b**, a été obtenu à l'issue de la réaction comme illustré dans le Schéma 46. Il aurait été intéressant d'utiliser des boranes plus encombrés que BH_3 tels que $\text{Si}a_2\text{BH}$ ou $\text{Th}x\text{BH}_2$ pour pouvoir comparer les régiosélectivités mais faute de temps, cela n'a pas pu être réalisé.

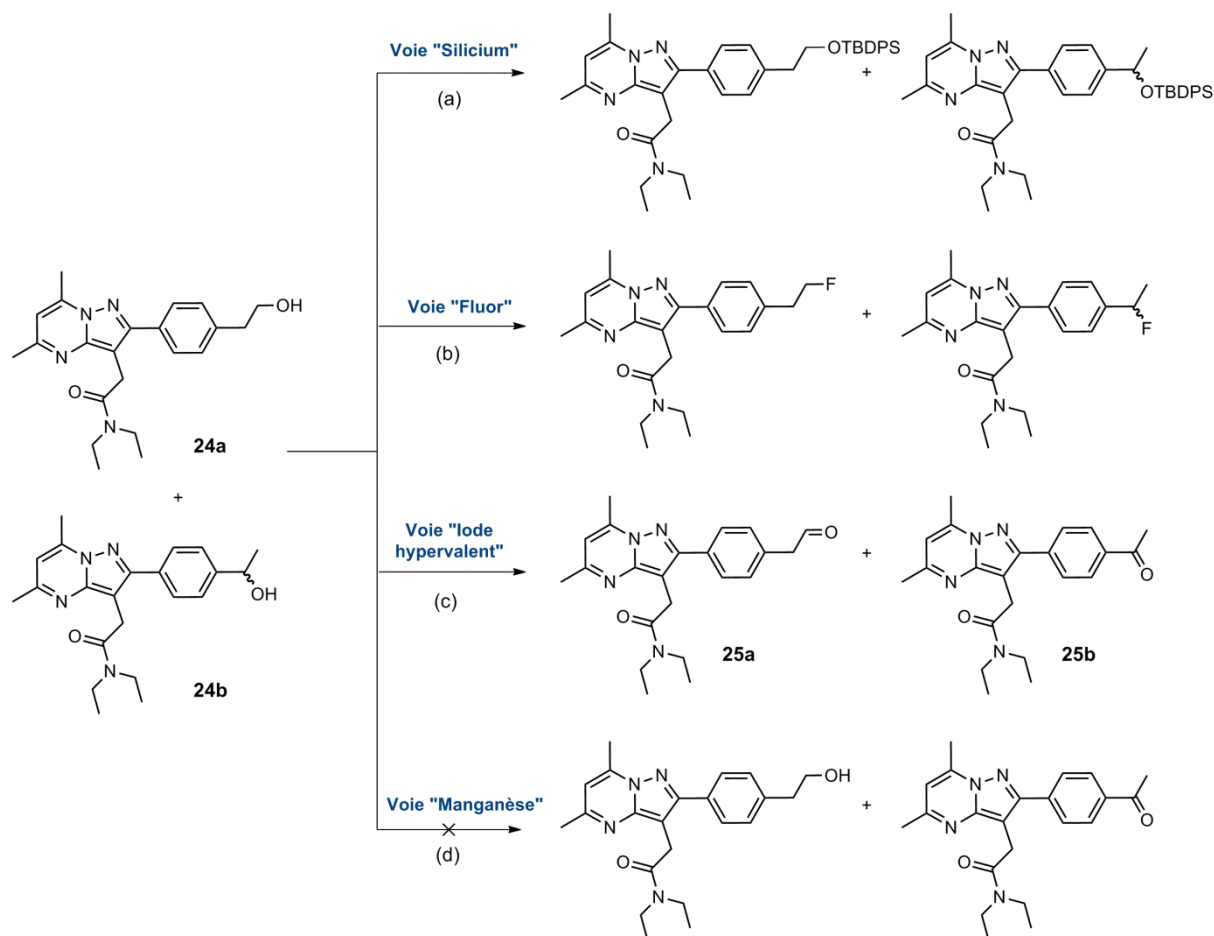


Réactifs et conditions: (a) tributylvinylétain, LiCl , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, DMF, t.a., 48 h ; (b) i. $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, 0 °C, 15 min puis t.a., 12 h - ii. NaOH , H_2O_2 , 0 °C puis t.a.

Schéma 46. Essai de synthèse de l'alcool **24a** par utilisation du complexe $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$.

Il a donc été nécessaire de trouver un moyen de séparer ces régioisomères afin d'isoler l'alcool terminal **24a** nécessaire à l'obtention de la cible C2ane. Pour cela, différentes approches décrites dans le Schéma 47 ont été envisagées. La première voie, dite "Silicium", a consisté à silyler de manière sélective l'alcool le moins encombré, c'est-à-dire le régioisomère désiré **24a**, par TBDPSCl . Expérimentalement, il a été observé que les deux régioisomères subissent la silylation et ce même à basse température (0 °C). Par ailleurs, les silyléthers correspondants n'ont pas pu être séparés par chromatographie préparative car ils co-éluent dans la plupart des éluants. Toujours dans l'optique de séparer **24a** et **24b**, il a été envisagé dans la voie "Fluor" de fluorer directement le mélange d'alcools de façon à obtenir la cible C2ane ainsi que son isomère en comptant sur une différence de polarité plus significative. Ainsi, cela aurait permis l'évaluation biologique des deux régioisomères. En pratique, cette seconde méthode n'a pas abouti car il n'a pas été possible de séparer les produits fluorés par chromatographie préparative.

¹⁰³ P. A. Wender, T. E. Glass, N. E. Krauss, M. Mühlebach, B. Peschke, D. B. Rawlins. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7662.



Réactifs et conditions: (a) TBDPSCl, DMAP, DCM, t.a., 24 h ; (b) Deoxofluor®, DCM, t.a., 48 h ; (c) DMP, DCM, t.a., 1 h (non isolés purs) ; (d) MnO₂ 10 eq, DCM, t.a., 48 h (pas de réaction).

Schéma 47. Essais de séparation des alcools **24a** et **24b** par différentes stratégies de dérivation.

Une troisième approche, la voie "Iode hypervalent" a consisté à oxyder le mélange d'alcools **24a** et **24b** avec un oxydant doux, le réactif de Dess-Martin (DMP) de façon à former l'aldéhyde **25a** et la cétone **25b**. Bien que les structures de ces molécules aient été identifiées sur le spectre RMN ¹H du brut réactionnel, il n'a pas été possible de les isoler avec une pureté et/ou une quantité suffisantes pour poursuivre la séquence qui comportait encore une réduction et la déhydroxyfluoruration pour arriver à la cible C2ane. L'aldéhyde **25a** en particulier semble s'être décomposé avant sa purification malgré un stockage sous atmosphère inerte. Une autre stratégie, la voie "Manganèse" a alors été envisagée. A la différence de la méthode au DMP, il a été entrepris d'oxyder uniquement l'alcool benzylique **24b** en mettant à profit la régiosélectivité de l'oxydation au dioxyde de manganèse (MnO₂). Cependant, aucune réaction n'a été observée après 48 h en présence de 10 eq de MnO₂ dans le DCM (suivi CCM et RMN ¹H). Compte-tenu des difficultés rencontrées pour la séparation des composés **24a** et **24b**, il a été décidé de reprendre la synthèse à partir du dérivé vinyli **23** et de mettre en oeuvre la stratégie par époxydation/réduction.

1.5.3. Résultats de la stratégie de synthèse par époxydation

Dans cette seconde approche, illustrée dans le **Schéma 48**, il a été entrepris d'obtenir la chaîne éthan-2-ol par époxydation du dérivé vinyl-DPA (**23**) suivie d'une hydrogénation. Bien qu'indirecte, cette méthode a été envisagée car l'époxyde obtenu peut être hydrogéné de façon sélective comme l'ont démontré Kwon *et al.*¹⁰⁴ En ce qui concerne l'époxydation, les réactifs les plus couramment employés sont les peracides, notamment l'acide *meta*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA). A première vue, le vinyl-DPA semble ne pas réagir avec le *m*-CPBA, ce qui accréderait l'hypothèse selon laquelle l'oléfine n'est pas suffisamment riche en électrons pour pouvoir réagir. Toutefois, il est possible que des produits secondaires de type *N*-oxyde se soient formés mais qu'ils n'aient pas été détectés (co-migration).

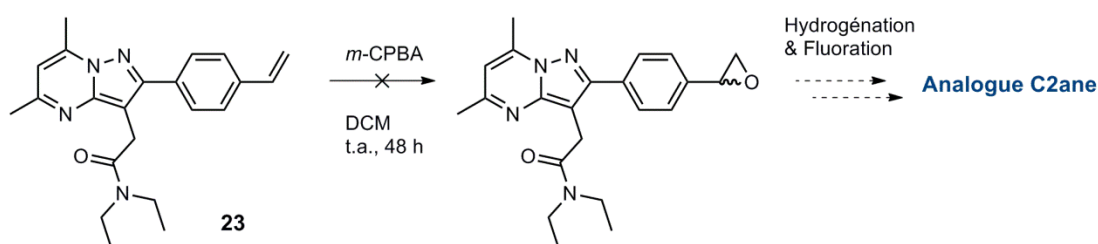


Schéma 48. Essai d'époxydation du vinyl-DPA **23**.

1.5.4. Conclusion sur la préparation de l'analogue C2ane

Les différentes tentatives de préparation de l'analogue C2ane n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré. Dans le cas de la stratégie d'hydroboration, le composé vinylé **23** n'a pas réagi avec le 9-BBNH mais il a donné un mélange de régioisomères avec BH_3 qu'il n'a pas été possible de séparer malgré différents essais de dérivatisation. En ce qui concerne la stratégie d'époxydation, le manque de réactivité de l'alcène **23** vis-à-vis du *m*-CPBA n'a pas permis de préparer l'époxyde visé. Etant donné que l'analogue C2ane ne représentait pas une cible prioritaire pour le projet de thèse, les recherches concernant sa synthèse ont été suspendues au profit d'une autre classe de molécules, celle des analogues alcènes.

2. Analogues alcènes

2.1. Cibles synthétiques

Dans le prolongement des cibles alcanes et alcynes, il a été envisagé de préparer des analogues alcènes dont les structures sont décrites dans la **Figure 21**. Il s'agit de quatre alcènes de stéréochimie *trans* dont la longueur de la chaîne carbonée latérale varie de trois ($n = 1$) à six ($n = 4$) atomes de carbone. Il a également été envisagé de préparer le stéréoisomère *cis*

¹⁰⁴ M. S. Kwon, I. S. Park, J. S. Jang, J. S. Lee, J. Park. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3417.

correspondant à l'analogue C3ène pour évaluer l'influence de la stéréochimie de la double liaison sur l'affinité pour la TSPO 18 kDa.

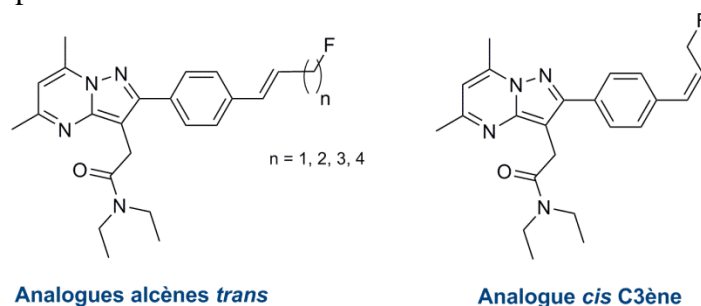


Figure 21. Structures générales des alcènes *trans* et de l'analogue *cis* C3ène à synthétiser.

2.2. Axes de recherches envisagés pour la synthèse des analogues alcènes

Les travaux ont été menés selon 3 axes de recherche résumés dans le **Schéma 49**:

- **Axe A:** Stratégie de synthèse totale pour l'analogue (*E*)-C3ène.
- **Axe B:** Couplages métallo-catalysés avec DPA-X ($X = \text{I}$, OTf ou vinyl) pour les analogues (*E*)-C4ène, (*E*)-C5ène et (*E*)-C6ène.
- **Axe C:** Hydrogénation partielle d'un dérivé alcyne pour l'analogue (*Z*)-C3ène.

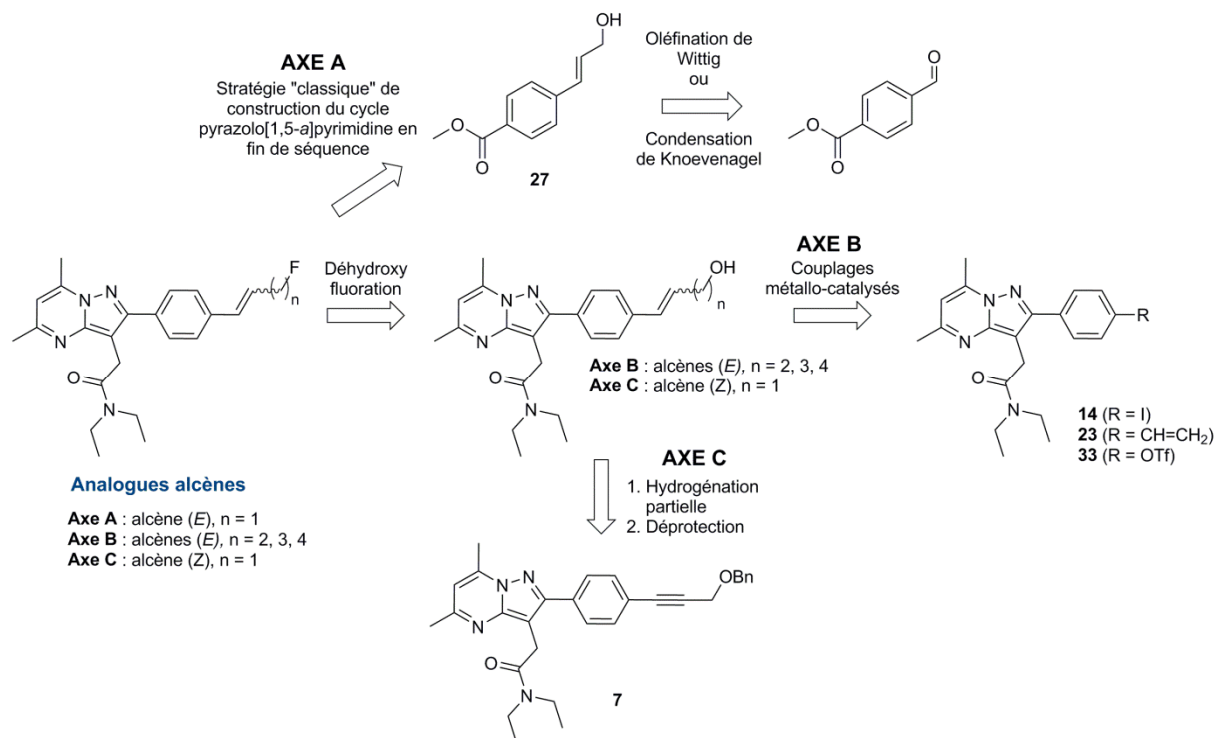


Schéma 49. Analyse rétrosynthétique des analogues alcènes selon les axes A, B et C.

2.3. Axe de recherche A: synthèse totale

2.3.1. Stratégies de synthèse de l'analogue C3ène

Comme pour la série alcane, il a d'abord été envisagé de synthétiser le plus simple des alcènes, l'analogue (*E*)-C3ène, dans le cadre de l'axe de recherche A. Pour cela, deux stratégies conduisant chacune à l'alcool **27** ont été mises en œuvre comme illustré dans le **Schéma 50**. L'intermédiaire **27** est important car il peut être considéré comme le synthon-clé de la synthèse de (*E*)-C3ène. En effet, il possède déjà la stéréochimie *trans* désirée et un groupement hydroxy facilement remplaçable par un atome de fluor. Le reste de la séquence menant à l'analogue (*E*)-C3ène est classique du point de vue de l'enchaînement des réactions c'est pourquoi le véritable enjeu de cet axe de recherche est la préparation de l'alcool **27**. La première stratégie de synthèse proposée comporte une seule étape et met en jeu une oléfinatation de Wittig entre le 4-formylbenzoate de méthyle et un ylure de phosphore à préparer au laboratoire. La seconde stratégie comporte quant à elle deux étapes : une condensation de Knoevenagel entre le 4-formylbenzoate de méthyle et l'acide malonique suivie de la réduction d'un dérivé de l'acide *trans*-cinnamique en alcool.

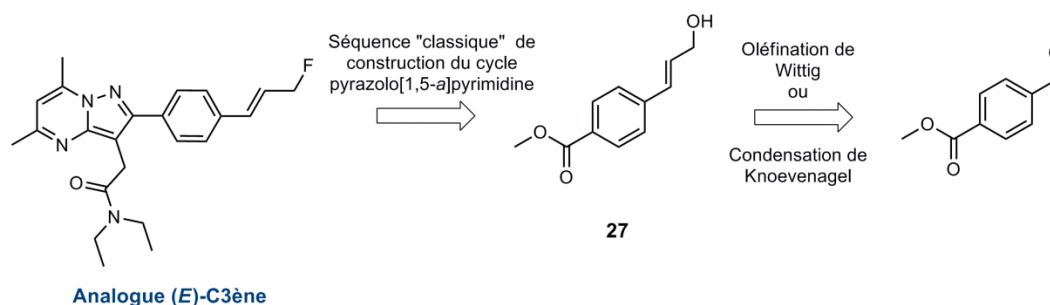
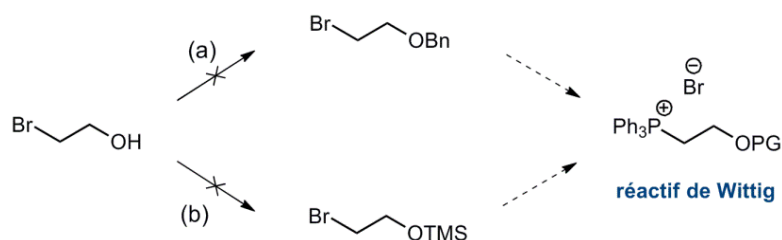


Schéma 50. Rétrosynthèse de l'analogue (*E*)-C3ène selon les deux stratégies de l'axe de recherche A.

2.3.2. Résultats obtenus avec la méthode « Wittig »

La stratégie « Wittig » s'est rapidement révélée difficile à mettre en œuvre dans la mesure où la préparation de l'ylure de phosphore nécessaire à la réaction a posé problème. La démarche initiale a dans un premier temps consisté à protéger la fonction alcool du 1-bromoéthan-2-ol par un groupement protecteur (TMS ou Bn) puis à utiliser le synthon correspondant pour alkyler la triphénylphosphine et ainsi générer le sel de phosphonium précurseur de l'ylure de phosphore (**Schéma 51**).



Réactifs et conditions: (a) i. NaH, THF, 0 °C, 10 min - ii. BnBr, 0 °C à t.a., 12 h ; (b) TMSCl, TEA, DCM, t.a., 3 h.

Schéma 51. Essai de synthèse du sel de phosphonium.

Des difficultés ont été rencontrées lors de la protection de l'alcool. Il est possible qu'elles soient dues à des réactions secondaires telles que l'éthérisation de Williamson intramoléculaire qui est thermodynamiquement favorisée puisqu'elle génère deux gaz: l'oxyde d'éthylène et le bromure d'hydrogène (**Schéma 52**).

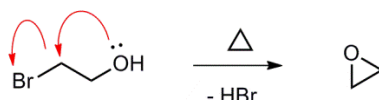


Schéma 52. Mécanisme de l'éthérisation de Williamson intramoléculaire.

Cette réaction a également pu se produire à température ambiante lors de l'essai de benzylation car de l'hydruide de sodium a été ajouté pour former un alcoolate lequel peut réagir selon une réaction similaire à celle décrite dans le **Schéma 52**. Pour contourner le problème, l'alkylation directe de la triphénylphosphine avec le 1-bromoéthanol non protégé a été tentée mais là encore sans succès (**Schéma 53**).

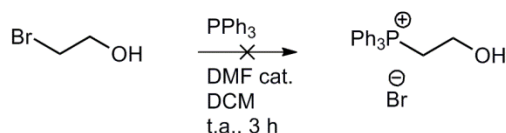


Schéma 53. Essai d'alkylation directe de la triphénylphosphine.

Il aurait été possible de se procurer des bromoéthers avec la fonction alcool déjà protégée par un groupement méthoxy, voire des sels de phosphonium mais ces composés étant particulièrement onéreux, il n'a pas été envisagé de les utiliser en début de séquence réactionnelle mais plutôt d'aborder la seconde approche : la méthode de « Knoevenagel ».

2.3.3. Résultats obtenus avec la méthode « Knoevenagel »

La condensation de Knoevenagel¹⁰⁵ présentée dans le **Schéma 54** entre le 4-formylbenzoate de méthyle et l'acide malonique en milieu basique a très bien fonctionné, l'acide **26** ayant été obtenu avec un rendement de 93 %.

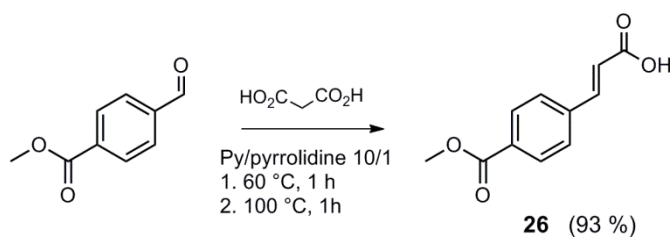
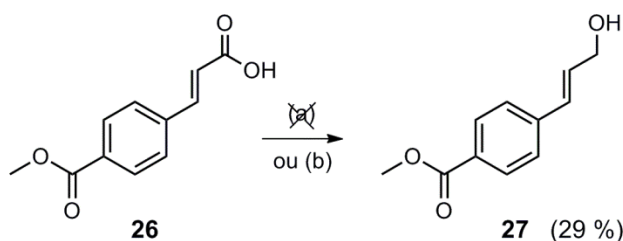


Schéma 54. Synthèse de l'acide **26** par condensation de Knoevenagel.

¹⁰⁵ Y. Nagao, K. Inoue, M. Yamaki, S. Takagi, E. Fujita. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 495.

Par ailleurs, l'extraction de l'acide a été particulièrement facile puisqu'il a suffi d'acidifier le milieu réactionnel à pH 2 pour faire précipiter le produit. L'analyse RMN ^1H a confirmé la stéréochimie *trans* de la double liaison avec la constante de couplage J^3_{HH} calculée des protons éthyléniques de 16 Hz.

Alors que la première étape n'a pas posé de problèmes particuliers, cela n'a pas été le cas pour la suite de la séquence. En effet, l'étape de réduction a été délicate à mettre en œuvre car il était question de réduire sélectivement la fonction acide carboxylique sans toucher au groupement ester. Pour cela, différentes méthodes d'activation ont été employées afin de favoriser la réduction sélective de l'acide. La première méthode essayée a été développée par Falorini *et al.*¹⁰⁶ et requiert la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (TCC) en tant qu'agent d'activation et le borohydrure de sodium en tant que réducteur. Appliquée à l'acide **26**, cette méthode n'a donné aucune réaction après 24 h à température ambiante (**Schéma 55**). Ces résultats sont d'autant plus surprenants que les auteurs sont parvenus à réduire l'acide cinnamique, structurellement très proche de **26**, avec un rendement de 93 %. Toutefois, Falorini *et al.* ont décrit la formation de produits de réduction de la double liaison représentant de 15 à 20 % du produit final en masse. Comme cette méthode n'a pas donné les résultats escomptés, une autre procédure faisant cette fois-ci intervenir le chlorophosphate de diéthyle a été mise en œuvre. Dans cette méthode, l'acide **26** est converti en un intermédiaire phosphoré qui est ensuite réduit par le borohydrure de sodium selon la voie (b) du **Schéma 55**.



Réactifs et conditions: (a) i. TCC, THF - ii. NaBH_4 , t.a., 24 h (pas de réaction) ; (b) i. $\text{P}(\text{OEt})_2\text{Cl}$, TEA, THF, t.a., 24 h - ii NaBH_4 , t.a., 5 h.

Schéma 55. Synthèse du synthon-clé **27** par réduction chimiosélective de l'acide **26**.

Cette procédure a permis d'obtenir l'alcool **27**, dont la structure a été confirmée par RMN ^1H , notamment par la présence d'un doublet caractéristique d'intégrale 2 observé à 4,35 ppm (CDCl_3) correspondant au groupement méthylène portant la fonction alcool. Cependant, cette méthode reste délicate à mettre en œuvre car la formation du phosphate intermédiaire est souvent incomplète et difficile à contrôler d'où un rendement modeste de 29 %. Par ailleurs, l'utilisation de diéthylchlorophosphate rend le changement d'échelle d'autant plus problématique qu'il est très toxique et qu'on le retrouve en fin de réaction car introduit en excès. Le coût élevé de l'aldéhyde de départ est également un inconvénient majeur puisqu'il faudrait partir de plusieurs dizaines de gramme de ce réactif pour achever une synthèse de 8-10 étapes.

¹⁰⁶ M. Falorni, A. Porcheddu, M. Taddei *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4395.

Ces limitations ont encouragé l'exploration d'un deuxième axe de recherche mettant à profit le travail déjà effectué en série alcane et alcène.

2.4. Axe de recherche B: couplages métallo-catalysés

2.4.1. Stratégies de synthèse envisagées

Contrairement à la première approche, l'axe de recherche B, illustré dans le **Schéma 56**, a eu pour objectif de mettre en jeu des réactions métallo-catalysées avec les « building-block » I-DPA (**14**) et vinyl-DPA (**23**), déjà synthétisés au cours des précédentes recherches, ainsi qu'avec le composé DPA-OTf (**33**), un nouveau partenaire de couplage obtenu à partir de DPA-713.

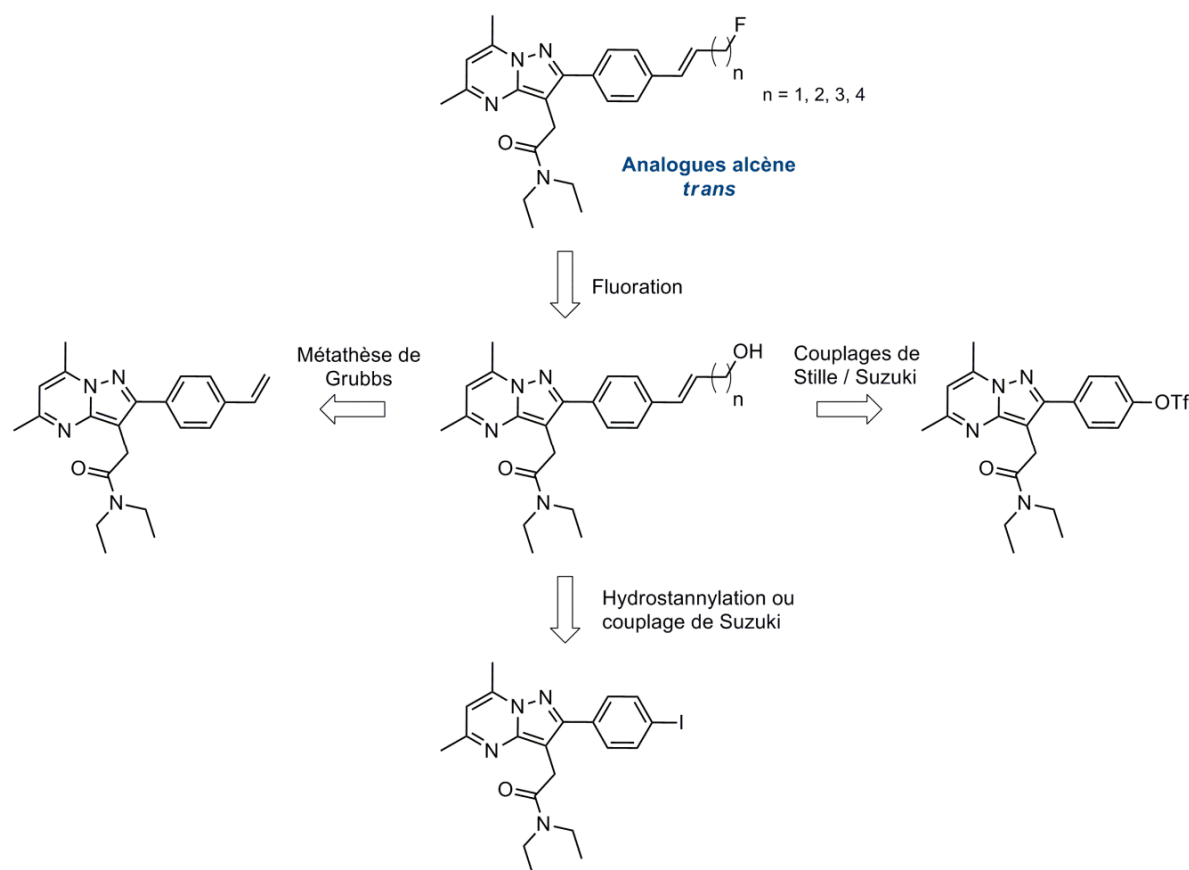


Schéma 56. Rétrosynthèses envisagées pour les analogues alcènes selon l'axe de recherche B.

Cette approche semble plus intéressante que la synthèse présentée dans l'axe A dans la mesure où elle permet d'atteindre toutes les cibles de la série alcène avec un gain de temps appréciable. La métathèse de Grubbs repose sur la réactivité de la liaison π du vinyl-DPA pour la faire réagir avec un carbène de ruthénium selon une cycloaddition [2+2]. Même s'il a été noté auparavant que la réactivité du vinyl-DPA semble assez limitée (pas d'époxydation), il paraissait intéressant de savoir si cet intermédiaire pouvait être valorisé pour ce type de réaction. En ce

qui concerne la stratégie d'hydrostannylation de I-DPA, il s'agit d'un couplage de Stille qui permettrait de greffer une chaîne alcène formée *in situ* par réduction d'un alcyne stannylé. Enfin, les couplages de Suzuki de I-DPA ou de DPA-OTf avec un pinacol borane commercial représentent une autre voie d'accès aux analogues alcènes.

2.4.2. Résultats obtenus pour la stratégie « Grubbs »

La métathèse de Grubbs, également appelée métathèse des oléfines, est une réaction permettant d'unir deux alcènes terminaux entre eux comme présenté dans le **Schéma 57**. Il s'agit d'une réaction catalysée par des carbènes métalliques (symbolisés par $[M]=$) principalement de ruthénium (catalyseur de Grubbs) ou de molybdène (catalyseur de Schrock). La métathèse peut être intermoléculaire ou intramoléculaire. Dans ce dernier cas, elle permet de cycliser une molécule et porte le nom de "Ring Closing Metathesis" ou RCM.

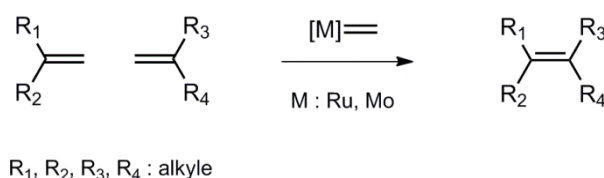
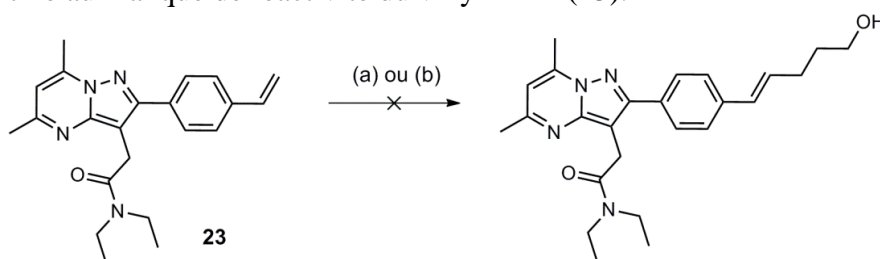


Schéma 57. Réaction générale d'une métathèse intermoléculaire des oléfines.

En ce qui concerne les analogues alcènes, il a été envisagé d'employer la réaction de métathèse intermoléculaire pour fusionner la liaison double de vinyl-DPA (**23**) avec celle d'un alcène terminal possédant déjà un groupement alcool en bout de chaîne. L'alcool utilisé pour établir la preuve de concept de cette stratégie a été le pent-1-èn-5-ol pour des raisons de disponibilité rapide au laboratoire. Ainsi, avec cette première méthode, c'est l'analogue (*E*)-C5ène qui a été visé. Des essais ont été réalisés à 35 °C dans le DCM avec des catalyseurs de Grubbs I ou II (première et deuxième génération) mais aucune réaction n'a été observée après 1 h de réaction (**Schéma 58**). Le fait que la réaction n'ait pas fonctionné avec le catalyseur de Grubbs II, qui est beaucoup plus réactif que le catalyseur de première génération, indique que le problème est probablement lié au manque de réactivité du vinyl-DPA (**23**).

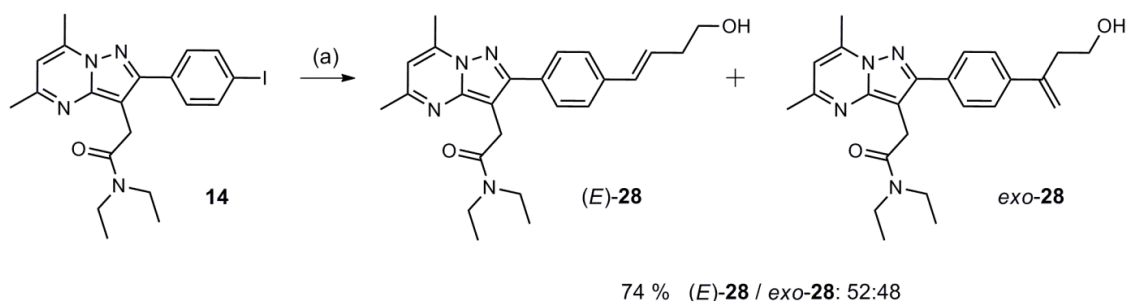


Réactifs et conditions: (a) pent-1-èn-5-ol, Grubbs I 5 mol%, DCM, 35 °C, 1 h ; (b) pent-1-èn-5-ol, Grubbs II 5 mol %, DCM, 35 °C, 3 h.

Schéma 58. Essai de synthèse de l'alcool C5énol par métathèse d'oléfin.

2.4.3. Résultats obtenus pour la stratégie d'hydrostannylation

La réaction d'hydrostannylation fait intervenir la réduction d'un alcyne en vinylstannane par action d'un dérivé stannylé en présence d'un réducteur.¹⁰⁷ Dans le cadre de la synthèse des analogues alcènes, il a été envisagé de coupler *in situ* ces vinylstannanes avec I-DPA (**14**) via un couplage de Stille. Ainsi, en partant d'un alcyne ayant déjà une fonction alcool en bout de chaîne, il semble possible d'obtenir en une seule étape les intermédiaires-clés menant aux analogues alcènes. Des essais ont été réalisés en faisant réagir I-DPA (**14**) à 80 °C avec le but-1-yn-4-ol en présence de Bu₃SnCl en tant qu'agent de stannylation, de Pd(PPh₃)₄ pour la catalyse et de polyhydrosiloxane (PMHS) en tant que réducteur d'après la procédure de Petrignet *et al.*¹⁰⁸ La réaction a bien fonctionné puisque le rendement a été de 74 % (**Schéma 59**). Toutefois, l'analyse RMN du produit obtenu a mis en évidence la contamination en régioisomère *exo*-**28** à hauteur de 48 % de l'alcool (*E*)-**28** attendu (**Figure 22**).



Réactifs et conditions: (a) i. but-1-yn-4-ol, Pd(PPh₃)₄, Bu₃SnCl, PMHS, KF, TBAF, THF/H₂O 10:1 v:v, 80 °C, 15 min - ii. **14**, 80 °C, 30 min.

Schéma 59. Hydrostannylation de I-DPA **14**.

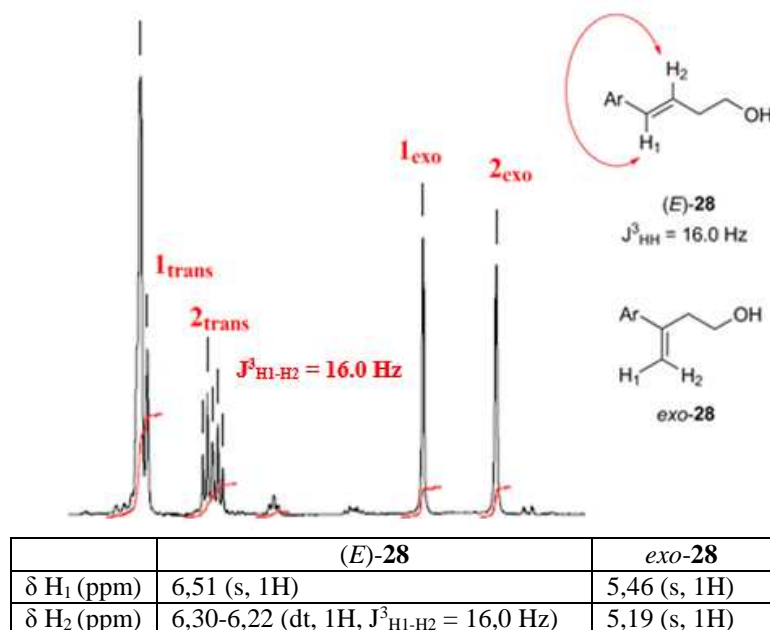


Figure 22. Signaux RMN ¹H des protons caractéristiques des alcools (*E*)-**28** et *exo*-**28** (CDCl₃).

¹⁰⁷ N. D. Smith, J. Mancuso, M. Lautens. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 3257.

¹⁰⁸ J. Petrignet, A. Boudhar, G. Blond, J. Suffert. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 3285.

Pour comprendre ces résultats, il est utile de rappeler le mécanisme de la réaction présenté dans le **Schéma 60**.

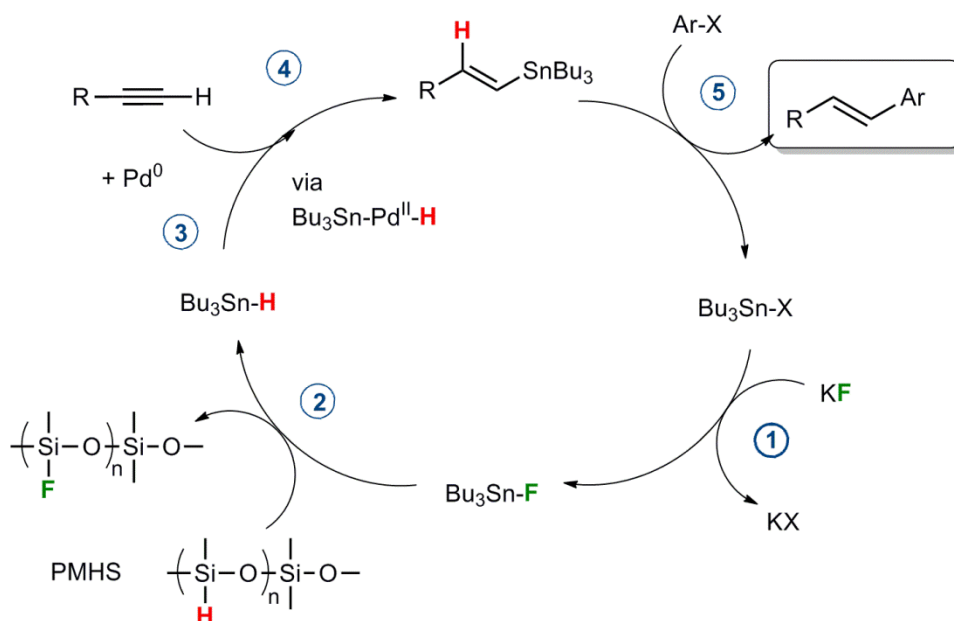


Schéma 60. Cycle catalytique de la réaction d'hydrostannylation.

La première étape (1) permet l'obtention de Bu_3SnF par échange d'halogène entre Bu_3SnCl et KF introduit en excès (3 eq). Ensuite, la très forte affinité du fluor pour le silicium ($E_{\text{Si-F}} = 565 \text{ kJ/mol}^{109}$) est mise à profit pour le faire réagir avec le poly(méthylhydroxiloxane) (PMHS) qui est un réducteur stable et non toxique. L'attaque de l'ion fluorure sur le silicium engendre la libération d'hydrures lesquels génèrent *in situ* l'espèce Bu_3SnH (2) qui va ensuite s'ajouter sur le catalyseur au palladium(0) (3). Le complexe organométallique va alors se fixer sur la triple liaison de l'alcyne et lui transférer son hydrure par une réaction de $\beta\text{-H}$ insertion (4). C'est précisément à cette étape que la stéréochimie du produit de réaction va être déterminée (ce dernier point sera développé un peu plus loin). Une fois que l'alcyne est entièrement converti en vinylstannane, I-DPA (14) (représenté par Ar-X) est ajouté au milieu réactionnel et subit alors un couplage de Stille (5) pour générer un alcène de même configuration que le stannane. Il est important de ne pas rajouter de l'alcyne une fois I-DPA introduit au risque de favoriser le couplage de Sonogashira correspondant (produit de couplage identifié en RMN ^1H) au détriment du couplage de Stille du vinylstannane. Comme nous l'avons indiqué un peu plus haut, la stéréochimie du vinylstannane est déterminée lors de l'étape de $\beta\text{-H}$ insertion (4). Expérimentalement, un mélange pratiquement équimolaire d'alcool (*E*)-**28** ($J_{\text{H1-H2}}^3 = 16,0 \text{ Hz}$) et de son régioisomère *exo*-**28** a été obtenu. Au niveau du cycle catalytique, cela signifie qu'il s'est formé le vinylstannane *trans* et son isomère *exo* où la fonction alcène est située en bout de chaîne (**Figure 23**).

¹⁰⁹ J. E. Huheey, E. A. Keiter, R. L. Keiter, *Chimie inorganique*, Ed. De Boeck, 1996.

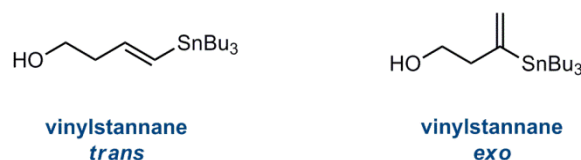


Figure 23. Vinylstannanes intermédiaires responsables de la stéréochimie des produits de l'hydrostannylation.

Sachant que dans les deux cas, la migration du groupement SnBu_3 et de l'hydrure se faisait du même côté de la triple liaison (*syn* addition), on s'attendait à ce que le vinylstannane *trans* soit majoritaire puisque dans cette configuration, les substituants les plus volumineux (chaines hydroxyéthyle et tributylstannyle) sont situés de part et d'autre de la double liaison (gêne stérique minimum). En ce qui concerne l'isomère *exo*, sa formation a été attribuée à la présence du groupe hydroxyle en bout de chaîne qui peut chélater l'étain et former un complexe stabilisé à 6 centres (**Schéma 61**).

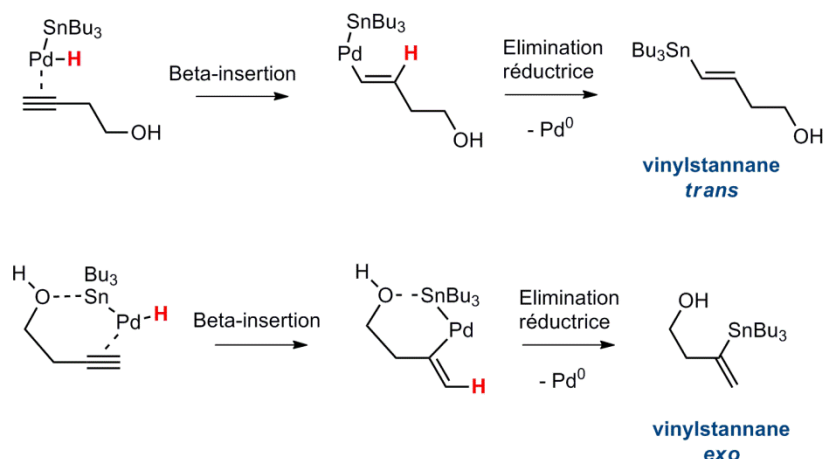
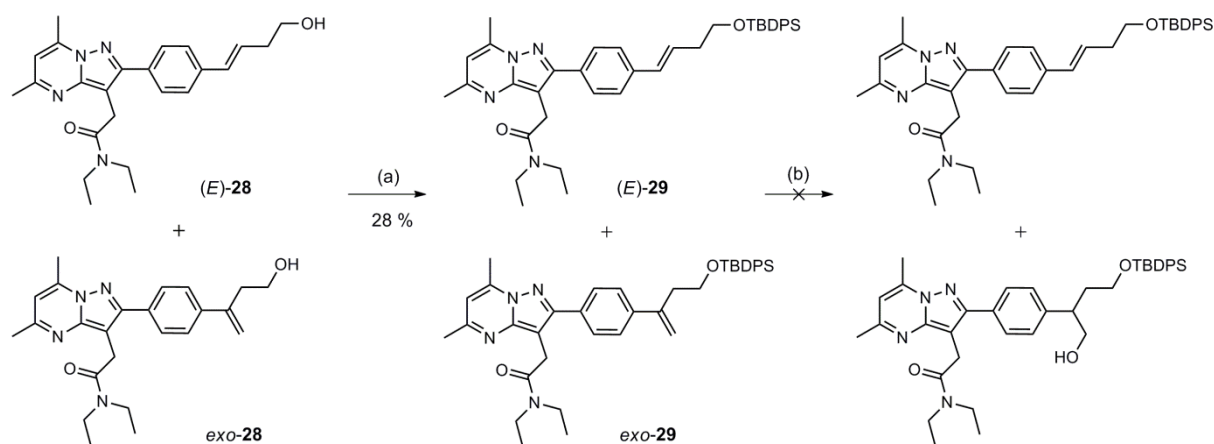


Schéma 61. Mécanismes suggérés pour la formation des vinylstannanes *trans* et *exo*.

Il aurait été intéressant d'observer l'effet de la longueur de chaîne de l'alcyne sur la proportion d'isomère *exo* dans le produit final pour confirmer cette hypothèse. De même, il aurait peut-être été possible d'améliorer la sélectivité de la β -H insertion en faveur du vinylstannane *trans* en fixant un groupement encombrant sur l'alcool ou en utilisant un acide de Lewis de type MgCl_2 de façon à gêner la formation du cycle à 6 centres et limiter la formation de l'isomère *exo* (**Schéma 61**). Ces pistes de recherches n'ont pas encore été explorées en raison de contraintes de temps. Toutefois, il a été entrepris de séparer le mélange d'alcools (*E*)-**28** et *exo*-**28** par dérivatisation de la liaison double.

Pour dérivatiser le mélange d'alcools, une silylation au TBDPSCl des groupements hydroxy a d'abord été réalisée et a permis d'obtenir les silyléthers (*E*)-**29** et *exo*-**29** avec un rendement de 28 % (**Schéma 62**). Ensuite, ce mélange a été soumis à une hydroboration oxydante avec le 9-BBNH avec comme objectif l'hydroxylation sélective de la liaison double du composé *exo*-**29**. De cette façon, il aurait été possible de séparer (*E*)-**29** du composé hydroxylé issu de l'hydroboration d'*exo*-**29**, plus polaire (**Schéma 62**).



Réactifs et conditions: (a) TBDPSCI, DMAP cat., Py, t.a., 12 h ; (b) i. 9-BBNH, THF, 0 °C à t.a., 15 h - ii. NaOH, H₂O₂, 0 °C à t.a., 12 h (pas de réaction).

Schéma 62. Essai de dérivatisation du mélange d'alcools isomères (*E*)-28 et *exo*-28.

En pratique, des problèmes de réactivité ont été rencontrés au niveau de l'hydroboration. En effet, alors qu'on s'attendait à ce que ce soit la liaison double de l'alcène *exo*-29, moins encombrée que celle de l'alcène (*E*)-29, qui soit hydroborée par le 9-BBNH, aucune réaction n'a été observée. Le même résultat a été obtenu même après le rajout de plusieurs équivalents de 9-BBNH et en laissant le milieu réactionnel jusqu'à 15 h avant l'hydrolyse oxydante. A la suite de cet essai, une tentative de dérivatisation du mélange d'alcools (*E*)-28 et *exo*-28 par déhydroxyfluoruration (non représentée sur le **Schéma 62**) a été entreprise. La réaction a fonctionné mais n'a cependant pas permis de différencier les deux produits de fluoruration en CCM pour une éventuelle séparation par chromatographie.

En raison des difficultés rencontrées lors des différentes tentatives de dérivatisation, une approche différente a été entreprise. Elle consiste à séparer les synthons stannylés avant couplage avec I-DPA (**14**). De cette façon, il semble possible de faire réagir le vinylstannane de stéréochimie *trans* avec I-DPA et ainsi d'obtenir l'alcène de même configuration, la réaction étant stéréospécifique. Des conditions expérimentales avaient déjà été décrites pour la synthèse du vinylstannane à chaîne propène (*E*)-30 par Emond *et al.*¹¹⁰ en 1997, c'est pourquoi les recherches ont commencé avec cet intermédiaire. L'hydrostannylation radicalaire a permis d'obtenir (*E*)-30 avec un rendement médiocre de 9 % car la réaction n'étant pas stéréosélective, elle a engendré une quantité non négligeable des stéréoisomères difficiles à séparer, en plus d'autres produits secondaires non identifiés (**Schéma 63**).

¹¹⁰ P. Emond, M. Boazi, A. Duchêne, S. Chalon, J. C. Besnard, D. Guilloteau, Y. Frangin *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1997**, 39, 757.

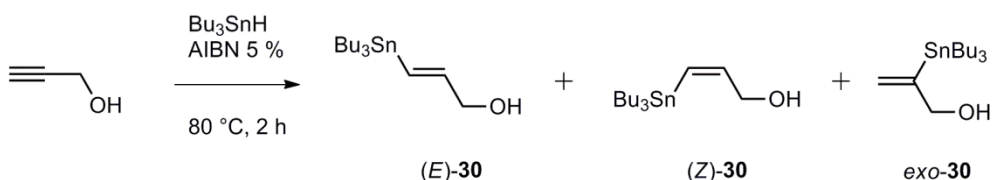


Schéma 63. Essai de préparation du stannane (*E*)-**30** par hydrostannylation radicalaire.

Malgré ces difficultés, il a été possible d'isoler différentes fractions par chromatographie flash sur gel de silice. L'analyse RMN ^1H a montré que la première fraction collectée contenait essentiellement le stannane (*Z*)-**30** dont la configuration *cis* a été confirmée par la constante de couplage J^3_{HH} de 12 Hz (15-16 Hz pour l'isomère *trans*). La spectroscopie de corrélation COSY a permis d'attribuer sans ambiguïté les autres signaux observés au stannane *exo*-**30** présent à hauteur de 43 % dans cette première fraction. La seconde fraction sortie de colonne correspond au vinylstannane visé (*E*)-**30**. Celui-ci a ensuite été engagé dans un couplage de Stille avec I-DPA sur une échelle de 50 mg comme illustré dans le **Schéma 64**.

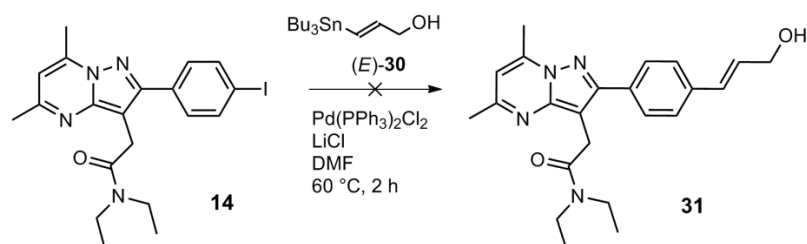
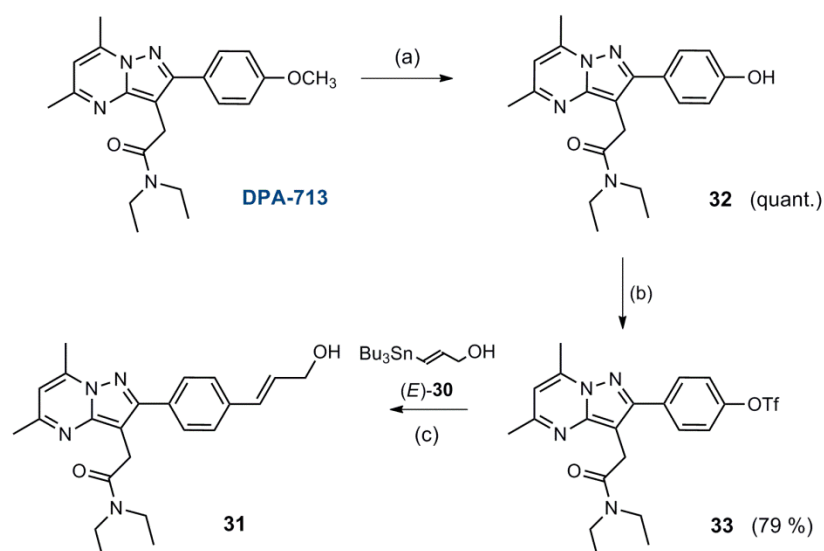


Schéma 64. Essai de couplage de Stille avec le stannane (*E*)-**30**.

Ce couplage a été effectué sous argon à 60 °C dans le DMF en présence de LiCl qui est connu pour accélérer l'étape de transméallation. Après 2 h de réaction, l'analyse CCM et RMN ^1H du brut réactionnel a montré que le produit principal résultait du remplacement de l'iode de I-DPA (**14**) par un groupement hydroxyle. Une réaction secondaire d'hydrolyse semble donc se produire pendant la réaction. Cela peut provenir du LiCl qui est un sel particulièrement hygroscopique employé ici en excès (3 eq). D'autres essais ont par la suite été réalisés en pré-pesant le LiCl et en le conservant dans l'étuve à 80 °C juste avant de l'ajouter au milieu réactionnel mais il n'y a pas eu d'améliorations significatives. Un autre essai a été réalisé en partant cette fois-ci de DPA-OTf (**33**) qui a été préparé au laboratoire à partir de DPA-713 selon la séquence décrite dans le **Schéma 65**.



Réactifs et conditions: (a) BBR_3 , DCM, -25°C , 2 h ; (b) Tf_2O , TEA, DCM, 0°C à t.a., 12 h ; (c) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, LiCl, tri-(2-furyl)phosphine, DMF, t.a. à 60°C , 2 h (**31** non isolé).

Schéma 65. Essai de synthèse de l'alcène **31** à partir de DPA-713.

Le composé DPA-OTf (**33**) a été engagé dans un couplage de Stille avec le vinylstannane (*E*)-**30** en présence de LiCl, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ et de tri-(2-furyl)phosphine dans le DMF à 60°C pendant 2 h. L'analyse RMN ^1H du brut réactionnel issu du couplage de Stille entre **33** et le stannane (*E*)-**30** (étape c) a révélé qu'il contenait environ 72 % de DPA-OH (**32**) et 28 % du dérivé (*E*)-C3énol (**31**). En plus d'être difficile à séparer par chromatographie (co-élution), le rendement estimé en alcène **31** était de seulement 7 % ce qui n'était pas suffisant pour explorer davantage cette voie de synthèse. D'autres réactions pallado-catalysées ont été envisagées telles que le couplage de Suzuki de I-DPA (**14**) avec un pinacol borane silylé commercial qui était potentiellement utilisable pour accéder à l'analogue (*E*)-C4ène (**Schéma 66**).

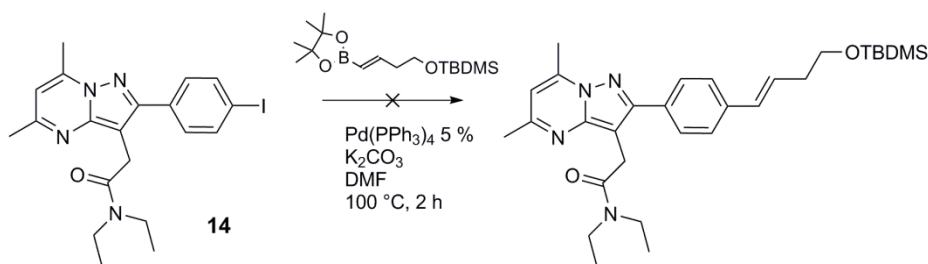


Schéma 66. Essai de couplage de Suzuki de I-DPA (**14**) avec un pinacol borane commercial.

La réaction entre I-DPA et le pinacolborane n'a donné aucune réaction après 2 h à 100°C dans le DMF en utilisant 5 mol% de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Il a ensuite été envisagé de coupler ce pinacolborane avec DPA-OTf (**33**) sur la base des travaux de Vasu *et al.*¹¹¹ Là encore, aucune conversion

¹¹¹ D. Vasu, H.-H. Hung, S. Bhunia, S. A. Gawade, A. Das, R.-S. Liu. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6911.

significative n'a été observée en CCM après 1 h à 90 °C (**Schéma 67**). Ces résultats globalement peu encourageants ont conduit à explorer l'axe de recherche C basé sur l'hydrogénation partielle des dérivés alcynes correspondants.

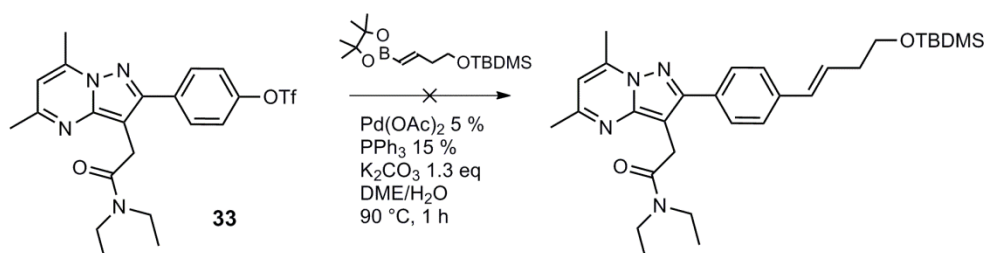


Schéma 67. Essai de couplage de Suzuki de DPA-OTf (**33**) avec un pinacol borane commercial.

2.5. Axe de recherche C: hydrogénation d'un dérivé DPA alcyne

2.5.1. Stratégie de synthèse envisagée

La stratégie de l'axe de recherche C, comme présentée dans l'analyse rétrosynthétique du **Schéma 68**, fait intervenir l'hydrogénation partielle de l'alcyne **7** de façon à obtenir un alcène *cis* à chaîne propènol. Cet alcène est l'intermédiaire-clé de cette stratégie puisqu'il permet d'obtenir l'analogue (Z)-C3ène par déhydroxyfluoruration. L'analogue (Z)-C3ène présente un intérêt synthétique car il serait intéressant de comparer son affinité pour la protéine TSPO 18 kD à celle de son stéréoisomère (E)-C3ène et ainsi, d'évaluer l'influence de la configuration de la chaîne latérale sur la valeur du K_i .

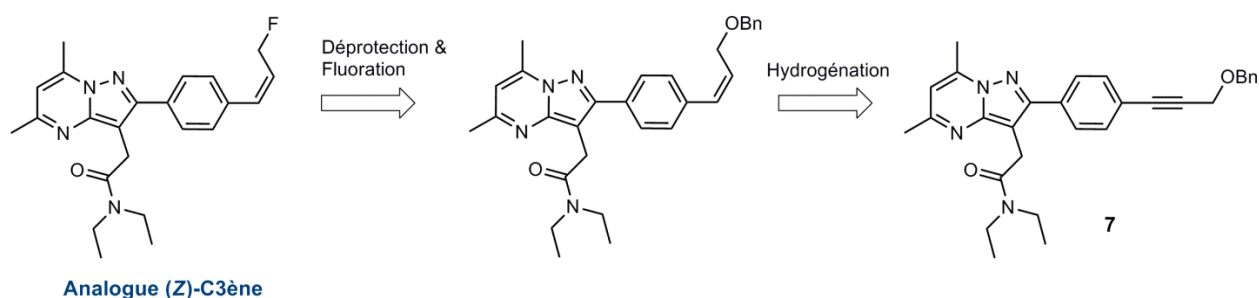


Schéma 68. Rétrosynthèse envisagée pour accéder à l'analogue (Z)-C3ène.

2.5.2. Résultats obtenus avec l'hydrogénation partielle d'alcyne

La stratégie de l'axe de recherche C est basée sur l'hydrogénation partielle d'une triple liaison. Le plus souvent, cela est réalisé en utilisant un catalyseur empoisonné pour diminuer son activité catalytique et ainsi favoriser l'hydrogénation partielle menant à l'alcène et non au dérivé saturé alcane. En ce qui concerne les systèmes catalytiques, il en existe une grande variété mais le plus couramment employé est le catalyseur de Lindlar qui se compose de 5 %

de palladium supporté sur une matrice CaCO_3 ou de BaCO_3 contenant des traces de plomb. Il est possible de rajouter divers additifs pour augmenter la sélectivité du catalyseur, en particulier des sulfures tels que le 3,6-dithia-1,8-octanediol ou des amines aromatiques comme la quinoléine. Dans notre cas, l'hydrogénation de l'alcyne **7** a été réalisée en présence de palladium de Lindlar ($\text{Pd}/\text{CaCO}_3+\text{Pb}$) en présence de quinoléine. Elle a permis de réduire la triple liaison et d'obtenir l'alcène (*Z*)-**34** dont la stéréochimie *cis* a été confirmée par RMN ^1H ($J_{\text{HH}}^3 = 11,6 \text{ Hz}$). Néanmoins, comme illustré dans le **Schéma 69**, la fraction isolée à l'issue de la purification a été contaminée par 20 % du stéréoisomère *trans* (*E*)-**34** et 10 % du produit complètement hydrogéné **35**.

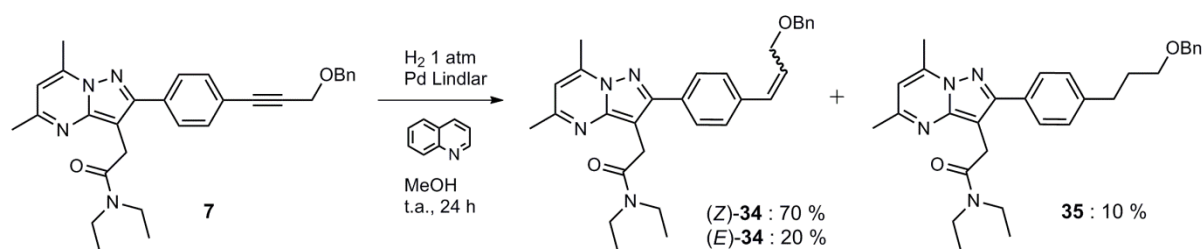


Schéma 69. Essai de synthèse de l'alcène **34** par hydrogénation partielle du benzyléther **7**.

Cela a posé problème étant donné que ces composés n'étaient pas complètement séparables par chromatographie. De manière générale, il a été délicat de s'arrêter au stade de l'alcène car l'hydrogénation n'était pas rapide, ce qui dans une certaine mesure favorisait l'hydrogénation complète. Cet axe d'étude a donc été mis de côté et les recherches se sont orientées vers la préparation d'autres analogues dont la stéréochimie ne posait pas autant de difficultés.

2.6. Conclusion sur la série alcène

Les recherches entreprises n'ont pas abouti à l'obtention d'analogues alcènes suffisamment purs pour être évalués *in vitro*. Les difficultés ont principalement été liées au manque de stéréosélectivité des réactions employées, en particulier pour l'hydrostannylation. Néanmoins, des résultats encourageants ont été obtenus lors du couplage de Stille du synthon stannylé (*E*)-**30** avec DPA-OTf (**33**) puisque l'alcène (*E*)-C3ènol (**31**) (**Schéma 65**) a été identifié dans le mélange final par RMN ^1H . Pour que cette voie de synthèse soit viable, il faudrait toutefois parvenir à optimiser les conditions opératoires pour limiter la formation de DPA-OH (**32**).

3. Analogue phényle

3.1. Cible synthétique

La série phényle ne contient qu'un seul analogue dans lequel l'atome de fluor est directement fixé au cycle benzénique en position *para* (**Figure 24**). Ce composé avait déjà été décrit et évalué *in vitro* par Selleri *et al.*⁸⁰ ($K_i = 9,2 \pm 1.0$ nM pour TSPO). L'évaluation biologique de ce composé *in vivo* doit permettre d'appréhender l'effet de la suppression de l'espaceur sur l'imagerie de la protéine TSPO 18 kDa.

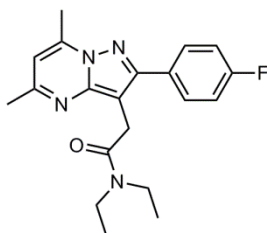


Figure 24. Structure de l'analogue phényle.

3.2. Stratégie de synthèse de l'analogue phényle

La stratégie de synthèse envisagée, basée sur l'analyse rétrosynthétique présentée dans le **Schéma 70**, est relativement rapide puisqu'elle ne comporte que 3 étapes. Le schéma rétrosynthétique fait apparaître un produit de départ commercial, le 3-(4-fluorophenyl)-3-oxopropanenitrile, dans lequel l'atome de fluor est déjà présent à la position souhaitée.

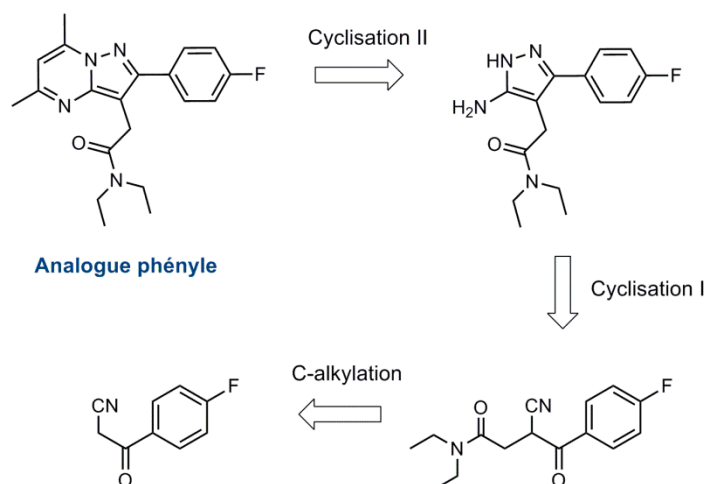
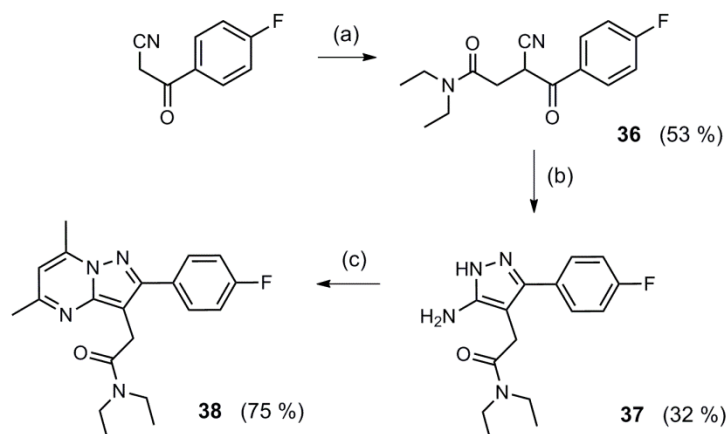


Schéma 70. Rétrosynthèse de l'analogue phényle.

3.3. Résultats obtenus pour la synthèse de l'analogue phényle

La préparation de l'analogue F-DPA (**38**) est présentée dans le **Schéma 71** et fait intervenir les étapes suivantes. La première étape de C-alkylation avec le *N,N*-diéthylchloroacétamide en

présence de NaOH et de NaI dans l'éthanol à t.a. pendant 48 h a donné de bons résultats puisque le 1,3-cétonitrile acétamide **36** a été obtenu avec un rendement de 53 % contre habituellement 30-40 % pour ce genre de réaction. En revanche, la première cyclisation, qui fait intervenir la condensation de l'hydrazine avec **36** en présence d'acide acétique dans l'éthanol au reflux pendant 5 h, a fourni le pyrazole **37** avec un rendement modeste de 32 %. La seconde cyclisation, dans laquelle le pyrazole **37** réagit avec l'acétylacétone au reflux dans l'éthanol pendant 3 h 30, a mieux fonctionné et a permis d'obtenir l'analogue phényle (**38**) avec un bon rendement de 75 %. De plus, lors de cette dernière étape, le produit final a spontanément cristallisé dans le milieu réactionnel, ce qui a facilité sa purification. Au final, la stratégie de synthèse employée s'est révélée efficace puisqu'elle a permis d'obtenir l'analogue phényle (**38**) avec un rendement global de 13 % sur 3 étapes. Plusieurs centaines de milligrammes de l'analogue phényle ont ainsi été obtenus de cette façon.



Réactifs et conditions: (a) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, t.a., 48 h ; (b) N₂H₄.H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 5 h ; (c) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 3 h 30.

Schéma 71. Schéma de synthèse de l'analogue phényle (**38**).

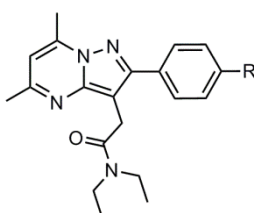
4. Evaluation physico-chimique, pharmacologique et métabolique *in vitro*

4.1. Série alcyne

Les propriétés physico-chimiques (solubilité, logD_{7,4} et clogD_{7,4}) et pharmacologiques *in vitro* (K_i) des quatre analogues alcynes **16a-d** ont été déterminées et comparées à celles de DPA-714 (**Tableau 6**).

Les logD_{7,4} (coefficient de partage *n*-octanol/tampon phosphate pH 7,4) des composés **16a-d** ont été déterminés sur la base de leurs temps de rétention mesurés par HPLC. Les valeurs de clogD_{7,4} ont été calculées par le logiciel ACD 11.0. Conformément à nos attentes, les valeurs mesurées et calculées de logD_{7,4} des alcynes **16a-d** sont plus élevées que celles de DPA-714 et augmentent avec la longueur de la chaîne carbonée latérale. Par ailleurs, alors que les analogues

C3yne **16a** et C4yne **16b** présentent des valeurs comparables, avec des $\log D_{7,4}$ de respectivement 3,61 et 3,67, les analogues C5yne **16c** et C6yne **16d** s'avèrent nettement plus lipophiles (4,06 et 4,35). Les solubilités de ces composés dans le tampon phosphate 50 mM sont toutes inférieures à 1 mg/L alors que celle de DPA-714 est de 6 mg/L. Ces résultats sont en concordance avec les valeurs de $\log D_{7,4}$ plus élevées des analogues **16a-d** comparées à DPA-714. Les affinités *in vitro* (K_i) des analogues **16a-d** pour la TSPO 18 kDa ont été mesurées par déplacement de [3 H]PK11195 sur des homogénats de membrane de cœur de rat. Toutes les molécules de cette série présentent une haute affinité pour la protéine avec des valeurs de K_i subnanomolaires - toutes inférieures à celle de DPA-714 - allant de 0,35 (**16c**) à 0,79 nM (**16d**), ainsi qu'une haute spécificité puisque ces composés n'ont aucune affinité pour le récepteur CBR (0 % d'inhibition de la fixation du [3 H]flunitrazépam, un ligand de CBR, à 1 μ M) (Tableau 6).



Analogue	R	$\log D_{7,4}$ ^a	$\text{clog} D_{7,4}$ ^b	Solubilité PBS (mg/mL) ^c	K_i (TSPO) (nM) ^d	CBR inhibition at 1 μ M (%)
DPA-714	O-(CH ₂) ₂ -F	2,89	3,21	6.10 ⁻³	0,91	0
16a	C≡C-CH ₂ -F	3,61	3,81	< 1.10 ⁻³	0,54	0
16b	C≡C-(CH ₂) ₂ -F	3,67	4,19	< 1.10 ⁻³	0,74	0
16c	C≡C-(CH ₂) ₃ -F	4,06	4,58	< 1.10 ⁻³	0,35	0
16d	C≡C-(CH ₂) ₄ -F	4,35	5,03	< 1.10 ⁻³	0,79	0

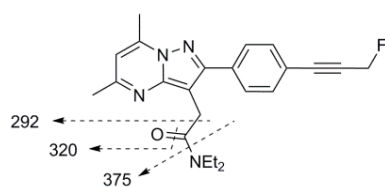
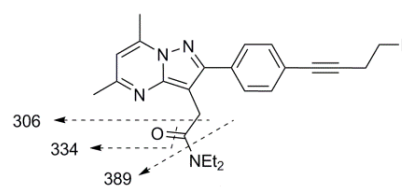
^a Voir note **112** pour la description de la détermination du $\log D_{7,4}$ par une méthode HPLC ; ^b Valeurs calculées avec le logiciel ACD 11.0 ; ^c Voir note **113** pour la description de la détermination de la solubilité dans le tampon phosphate 50 mM (pH 7,4) ; ^d Valeurs déterminées en utilisant des homogénats de membrane de cœur de rat en présence de [3 H]PK11195 (K_d = 1,8 nM, C = 0,2 nM).

Tableau 6. Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de DPA-714 et des analogues alcynes **16a-d**.

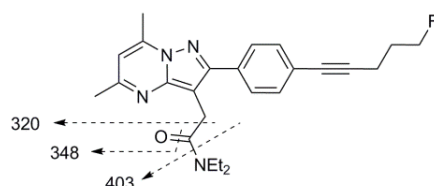
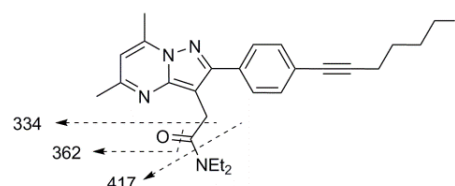
¹¹² **Détermination du $\log D_{7,4}$ (HPLC).** Le temps de rétention des analogues a été converti en valeurs de $\log D_{7,4}$ en utilisant une méthode HPLC validée et standardisée (corrélation entre les temps de rétention et des valeurs connues de $\log D$ de composés similaires). Conditions HPLC: colonne Alliance 2695 - PDA Waters, X-Terra MS C18 (4.6x20 mm, 3,5 μ m) ; phase mobile: 5 mM MOPS / (CH₃)₄NOH pH 7,4 (A), 5 % MOPS / (CH₃)₄NOH (100 mM, pH 7,4) / 95 % CH₃CN (B) ; gradient (A / B): 98:2 (0,5 min), 0:100 (4,8 min), 98:2 (1,6 min) ; 1,2 mL/min ; 25 °C ; détection à 254 nm.

¹¹³ **Détermination de la solubilité dans le tampon phosphate 50 mM (pH 7,4).** Le tampon phosphate 50 mM (pH 7,4) (préparé à partir de 40,5 mL aq. 0,1 M Na₂HPO₄ (40,5 mL), aq. 0,1 M NaH₂PO₄ (9,5 mL) ramené à 100 mL avec de l'eau déminéralisée) a été ajouté à une masse connue des composés à tester afin d'atteindre une concentration de 2 mg/mL. Le mélange a ensuite été agité pendant 20 h (Shaker Rock and Roll), puis filtré sous vide en utilisant un filtre Solvinert Millipore (0,45 μ m, PTFE hydrophile). Puis, la concentration du filtrat a été déterminée par un titrage HPLC utilisant une solution à 0,2 mg/mL (soniquée 10 min à t.a.) du composé à tester dans le DMSO. Conditions HPLC: colonne Acquity BEH C18 (50x2,1 mm, 1,7 μ m) ; phase mobile: H₂O + 0,05% TFA (A) / CH₃CN + 0,035% TFA (B), gradient (A / B): 98:2 (3,5 min), 0:100 (4 min), 1 mL/min, 40 °C.

La stabilité des analogues alcynes **16a-d** a également été déterminée grâce à l'analyse LC-MS et MS-MS des métabolites produits par des microsomes après une incubation de 30 minutes (collaboration interne) (**Tableau 7**). Cette étude a prouvé que la chaîne fluorée latérale n'est pas touchée par l'action des microsomes.¹¹⁴ Au final, l'analogue C5yne **16c** a démontré la meilleure affinité pour TSPO 18 kDa ($K_i = 0,35$ nM) et un profil de métabolisation *in vitro* favorable, c'est pourquoi il a été choisi pour être radiomarké au fluor-18 et évalué *in vivo* en imagerie TEP. En effet, malgré le profil de métabolisation *in vitro* satisfaisant de l'analogue fluoropropynyl **16a**, qui présente également une meilleure affinité pour la TSPO 18 kDa que DPA-714, un logD plus adéquat que **16c** et pour lequel l'incubation microsomiale ne génère que deux métabolites principaux après 30 min, c'est l'analogue C5yne **16c** qui a été finalement choisi pour le radiomarquage en raison des difficultés associées à la synthèse du précurseur tosylé de **16a**. De plus, le radiomarquage au fluor-18 de molécules structurellement proches de **16c** a déjà été réalisé avec succès au laboratoire, renforçant le choix de cette molécule en tant que candidat au radiomarquage.


16a (MW 392)

16b (MW 406)

Composés	t_R (min) ^a	$[M+H]^+$	Fragments ^b	t_R (min) ^a	$[M+H]^+$	Fragments ^b
Parent	15,66	393	375, 346, 320, 292	15,81	407	389, 360, 334, 306
M1	11,41	365 (-28)	347, 320, 292	11,68	379 (-28)	361, 334, 306
M2	11,0	409 (+16)	391, 362, 336, 308	11,19	423 (+16)	405, 376, 350, 322
M3	-	-	-	10,01	423 (+16)	405, 376, 350, 322
M4	-	-	-	5,89	439 (+32)	421, 392, 366, 338


16c (MW 420)

16d (MW 434)

Composés	t_R (min) ^a	$[M+H]^+$	Fragments ^b	t_R (min) ^a	$[M+H]^+$	Fragments ^b
Parent	17,05	421	403, 348, 320	15,81	435	417, 362, 334
M1	12,08	393 (-28)	375, 348, 320	11,68	407 (-28)	362, 334, 306
M2	11,37	437 (+16)	419, 364, 336	11,19	451 (+16)	433, 404, 378, 350
M3	8,92	437 (+16)	419, 364, 336	10,01	451 (+16)	433, 404, 378, 350
M4	3,43	453 (+32)	435, 380, 353	5,89	467 (+32)	449, 420, 394, 366

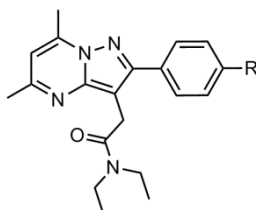
^a Conditions HPLC: colonne Atlantis C18, 2,1 x 150 mm, 5 μ m, phase mobile: H₂O + 0,05 % acide formique (A) / CH₃CN + 0,05 % acide formique (B), gradient (A / B) : 60:40 à 20:80 (20 min), 200 μ L/min, détection à 275 nm.

Tableau 7. Analyses LC-MS et MS-MS des métabolites des analogues alcynes **16a-d** par incubation microsomiale *in vitro*.

¹¹⁴ V. Médran-Navarrete, A. Damont, M.-A. Peyronneau, B. Kuhnast, N. Bernards, G. Pottier, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard, F. Dollé. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 1550.

4.2. Série alcane

Les propriétés physico-chimiques (solubilité, $\log D_{7,4}$ et $\text{clog} D_{7,4}$) et pharmacologiques (K_i) des analogues alcanes **10** et **18a-c** ont été déterminées dans les mêmes conditions que pour les analogues alcynes et comparées aux résultats obtenus pour DPA-714 (**Tableau 8**).



Analogue	R	$\log D_{7,4}$	$\text{clog} D_{7,4}$	Solubilité PBS (mg/mL)	K_i (TSPO) (nM)	CBR inhibition at 1 μM (%)
DPA-714	O-(CH ₂) ₂ -F	2,89	3,21	6.10 ⁻³	0,91	0
10	(CH ₂) ₃ -F	3,51	4,22	67.10 ⁻³	0,37	0
18a	(CH ₂) ₄ -F	3,90	4,78	3.10 ⁻³	0,86	0
18b	(CH ₂) ₅ -F	4,31	5,27	< 1.10 ⁻³	0,54	3
18c	(CH ₂) ₆ -F	4,70	5,78	< 1.10 ⁻³	0,45	12

Tableau 8. Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de DPA-714 et des analogues alcanes **10** et **18b-d**.

Comme pour les analogues alcynes, le $\log D_{7,4}$ des analogues alcanes, qui traduit la lipophilie des molécules, augmente avec l'allongement de la chaîne carbonée. Mis à part l'analogue à chaîne propyle **10**, tous les analogues alcanes sont plus lipophiles que leurs homologues alcynes pour une longueur de chaîne donnée. Ainsi, l'analogue à chaîne hexyle C6ane **18c** a un $\log D_{7,4}$ de 4,70 alors que la version alcyne à chaîne hexynyle **16d** présente un $\log D_{7,4}$ de 4,35 (**Tableau 6** et **Tableau 8**). Cette différence peut s'expliquer par la présence de la triple liaison qui génère localement une légère polarisation par un effet électronique. En ce qui concerne les affinités pour la TSPO 18 kDa, comme pour la série alcyne, elles sont meilleures que celle du ligand de référence DPA-714. Les plus hautes affinités ont été obtenues avec les analogues C3ane **10** et C6ane **18c** avec un K_i de 0,37 et 0,45 nM respectivement. Néanmoins, le composé **18c** présente une affinité non nulle pour le récepteur CBR puisqu'il est capable d'inhiber la fixation du [³H]flunitrazépam à 1 μM à hauteur de 12 %. Cela ne semble donc pas être le candidat idéal pour l'imagerie TEP puisqu'il n'est pas spécifique de la TSPO 18 kDa. Le même cas de figure a été observé avec l'analogue **18b** mais dans une proportion moindre (3 % d'inhibition à 1 μM). Finalement, l'analogue C3ane **10** a été choisi dans cette série pour être radiomarké au fluor-18 et évalué *ex vivo* / *in vivo* en imagerie TEP. Dans la suite du manuscrit, l'analogue C3ane **10** a été désigné par la dénomination CfO-DPA-714 car ce ligand résulte du remplacement de

l'atome d'oxygène de la chaîne latérale de DPA-714 par un atome de carbone (« C for O exchange »).

Le profil métabolique de CfO-DPA-714 (**10**) a également été déterminé par incubation *in vitro* avec des microsomes. Comme pour les analogues alcynes, il a été observé que la chaîne fluorée latérale n'est pas métabolisée (**Tableau 9** et **Schéma 72**). Ces résultats confirment que le remplacement de l'atome d'oxygène de DPA-714 par un carbone est une stratégie efficace pour éviter la défluoroalkylation.

Composé m/z [M+H ⁺]	CfO-DPA-714 (10)	Hydroxylation	N-dééthylation	Dihydroxylation	Hydroxylation + N-dééthylation
Parent	397	413 (+16)	369 (-28)	429 (+32)	385 (-28, +16)
Fragments	379	395	351	411	367
	350	366	322	382	338
	324	340	324	356	340
	296	312	296	328	312

Tableau 9. Détermination des métabolites de CfO-DPA-714 par LC-MS et MS-MS.

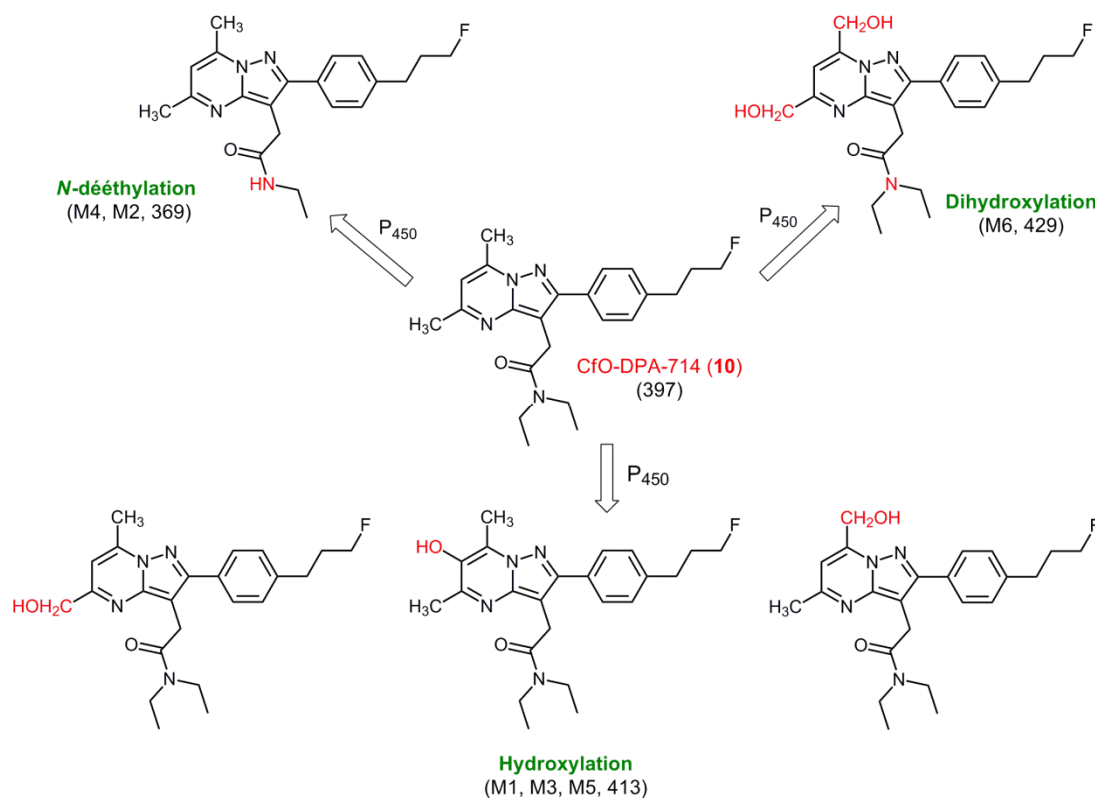
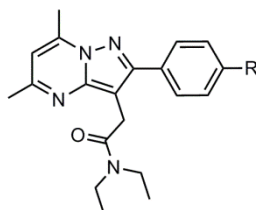


Schéma 72. Principales voies de métabolisation de CfO-DPA-714 (**10**) observées *in vitro* par incubation microsomiale au bout de 30 min.

4.3. Série phényle

Les propriétés physico-chimiques (solubilité, $\log D_{7,4}$ et $\text{clog} D_{7,4}$) et pharmacologiques (K_i) de l'analogue phényle (**38**) ont été déterminées dans les mêmes conditions qu'avec les analogues alcynes et comparées aux résultats obtenus avec DPA-714 (**Tableau 10**).



Analogue	R	$\log D_{7,4}$	$\text{clog} D_{7,4}$	Solubilité PBS (mg/mL)	K_i (TSPO) (nM)	CBR inhibition at 1 μM (%)
DPA-714	O-(CH ₂) ₂ -F	2,89	3,21	6.10 ⁻³	0,91	0
38	F	3,07	3,21	6.10 ⁻³	2,20	0

Tableau 10. Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de l'analogue phényle (**38**).

Avec un $\log D_{7,4}$, déterminé par HPLC, de 3,07, l'analogue phényle (**38**) est légèrement plus lipophile que DPA-714. Même si son affinité est moins bonne ($K_i = 2,20$ nM) que celle de DPA-714, il a quand même été envisagé de préparer une version marquée au fluor-18 de F-DPA car ce ligand reste spécifique de la protéine TSPO 18 kDa (0 % d'inhibition de la fixation du [³H]flunitrazépam à 1 μM).

5. Synthèse des précurseurs de radiomarquage

Les recherches précédentes ont montré la haute affinité et sélectivité des analogues DPA-C5yne (**16c**), CfO-DPA-714 (**10**) et F-DPA (**38**) pour la TSPO 18 kDa. Dans ce chapitre, il a été entrepris de synthétiser les précurseurs de radiomarquage au fluor-18 de chaque composé.

5.1. Série alcyne

5.1.1. Cible synthétique

Pour rappel, un précurseur de radiomarquage au fluor-18 est une molécule capable d'accepter un atome de fluor-18 dans sa structure. La molécule radiomarkée a une structure identique à celle de la version non radioactive, communément désignée par « référence froide », à la différence près que l'atome de fluor est radioactif. En série alcyne, le fluor-18 est incorporé sur

une chaîne carbonée aliphatique. Ainsi, il a été envisagé de préparer un précurseur comportant un groupement partant déplaçable par l'anion [^{18}F]fluorure (**Figure 25**).

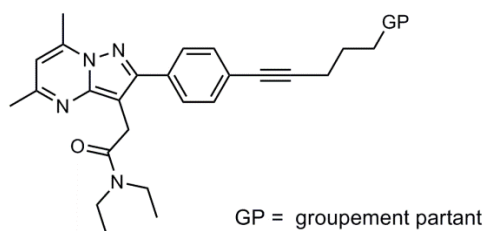


Figure 25. Structure générale du précurseur de radiomarquage de [^{18}F]DPA-C5yne.

5.1.2. Stratégie de synthèse du précurseur de marquage de [^{18}F]DPA-C5yne

La stratégie de synthèse du précurseur de marquage de [^{18}F]DPA-C5yne envisagée est identique à celle des analogues alcynes à l'exception de l'étape finale qui est dans ce cas l'activation et non la déhydroxyfluoruration de l'alcool **15c** (**Schéma 73**).

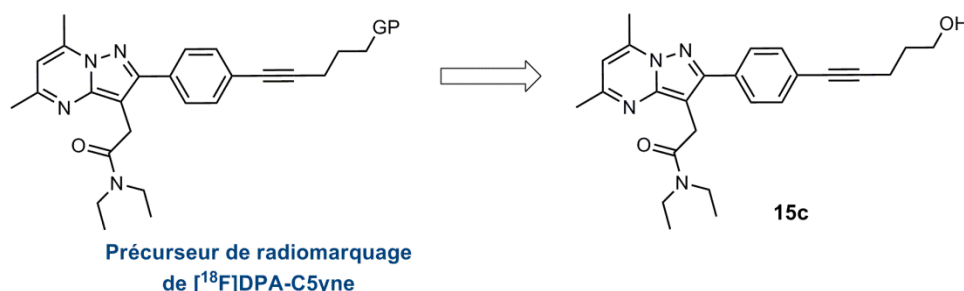
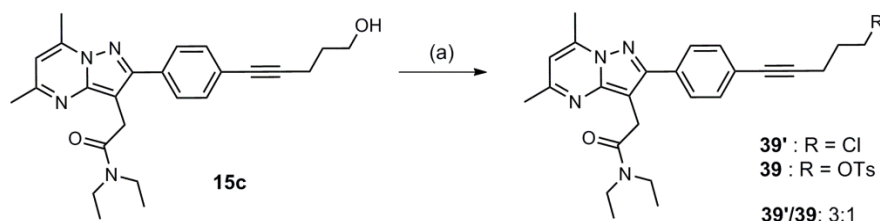


Schéma 73. Voie d'obtention du précurseur de radiomarquage de [^{18}F]DPA-C5yne.

Comme cela a été abordé dans la section 2.1.1. du chapitre 1 de la partie « introduction et généralités », le groupement tosylate est un groupement partant adapté à la substitution nucléophile aliphatique par les ions [^{18}F]fluorures c'est pourquoi il a été choisi pour préparer le précurseur de radiomarquage au fluor-18.

5.1.3. Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage de [^{18}F]DPA-C5yne

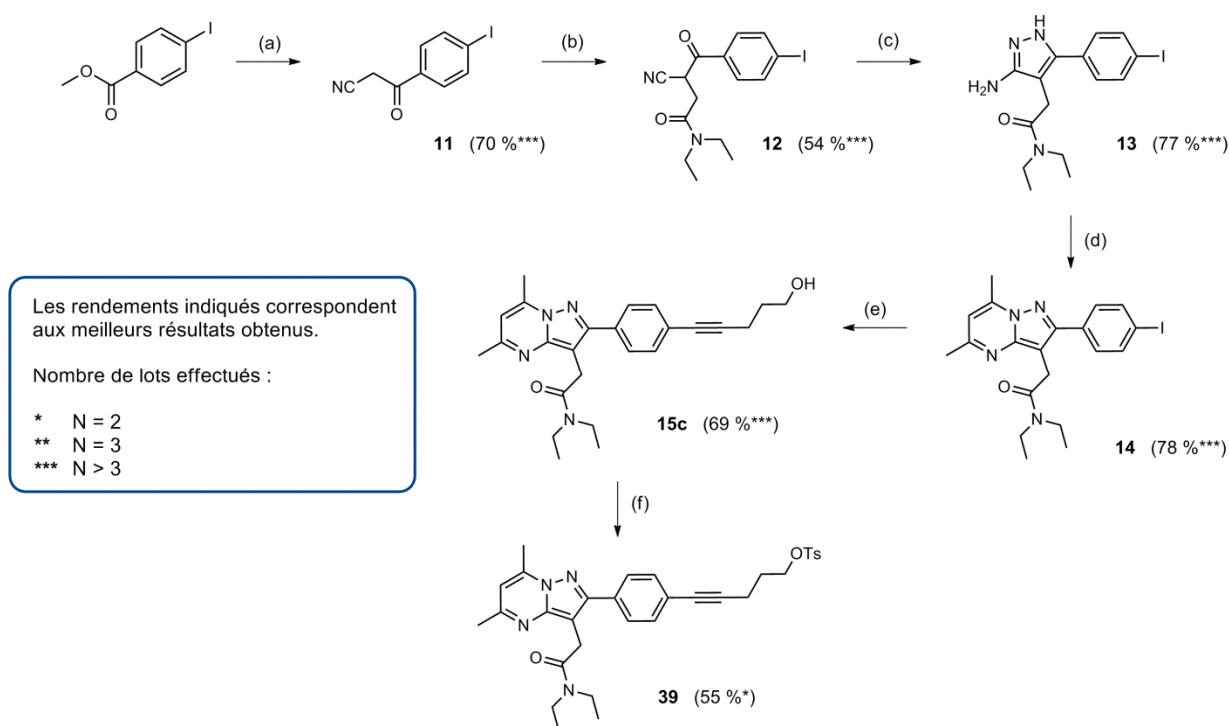
Les cinq premières étapes de préparation de l'alcool **15c** ont déjà été présentées dans le **Schéma 37** de la section 1.3.2. et ne seront donc pas de nouveau commentées. Les premiers essais d'activation de l'alcool **15c** par formation d'un tosylate ont été réalisés avec le chlorure de tosyloxy dans la pyridine à t.a. pendant 1 h mais il a été observé la formation majoritaire de l'analogue chloré de DPA-C5yne résultant de la substitution nucléophile du groupement tosylate par les ions chlorures présents dans le milieu réactionnel (**Schéma 74**).



Réactifs et conditions: (a) TsCl, Py, 0 °C à t.a., 1 h.

Schéma 74. Essai de tosylation de **15c** conduisant en partie à la formation de l'analogue chloré.

Par la suite, le chlorure de tosyte a été remplacé par son anhydride ce qui a permis d'éviter le précédent problème. Ainsi, le précurseur de $[^{18}\text{F}]$ DPA-C5yne (**39**) a été obtenu avec un rendement de 55 % par action de Ts_2O sur l'alcool **15c** en présence de triéthylamine et d'une quantité catalytique de DMAP dans le DCM à t.a. pendant 5 h comme illustré dans le **Schéma 75**. Le rendement global de synthèse de **39** a été de 9 % sur 6 étapes. Plusieurs dizaines de milligrammes de ce précurseur ont ainsi été préparés de façon à pouvoir aborder les essais de radiomarquage au fluor-18.



Réactifs et conditions: (a) i. *n*-BuLi, CH_3CN , THF, -60 °C, 30 min - ii. 4-iodobenzoate de méthyle, -60 °C, 1 h puis -45 °C, 2 h ; (b) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. $\text{ClCH}_2\text{C(O)NEt}_2$, NaI, t.a., 4 j ; (c) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 3 h ; (d) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 5 h ; (e) 4-pent-yn-1-ol, CuI, $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, TEA, t.a., 72 h ; (f) Ts_2O , TEA, DMAP cat., DCM, 0 °C à t.a., 5 h.

Schéma 75. Schéma de synthèse du précurseur de radiomarquage de $[^{18}\text{F}]$ DPA-C5yne **39**.

5.2. Série alcane

5.2.1. Cible synthétique

Dans la série alcane, l'analogue ayant démontré la meilleure affinité et spécificité pour la protéine TSPO 18 kDa s'est avéré être CfO-DPA-714 (**10**), anciennement nommé C3ane. Il a donc été entrepris de synthétiser un précurseur de marquage de [^{18}F]CfO-DPA-714 (**Figure 26**).

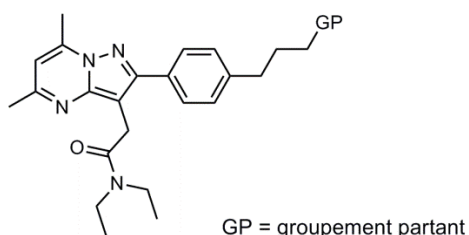


Figure 26. Structure générale du précurseur de radiomarquage de [^{18}F]CfO-DPA-714.

5.2.2. Stratégie de synthèse du précurseur de marquage de [^{18}F]CfO-DPA-714

Comme en série alcyne, il a été envisagé d'incorporer le fluor-18 en introduisant un groupement partant déplaçable par les ions [^{18}F]-fluorures. Le choix de ce groupement partant s'est une nouvelle fois orienté vers le groupement tosylate car il a donné de bons résultats en série alcyne. Il apparaît que le précurseur de [^{18}F]CfO-DPA-714 peut être préparé à partir de l'alcool **9** précédemment synthétisé (**Schéma 76**).

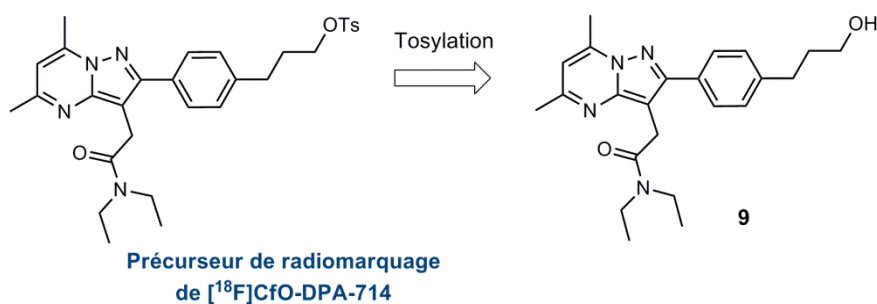
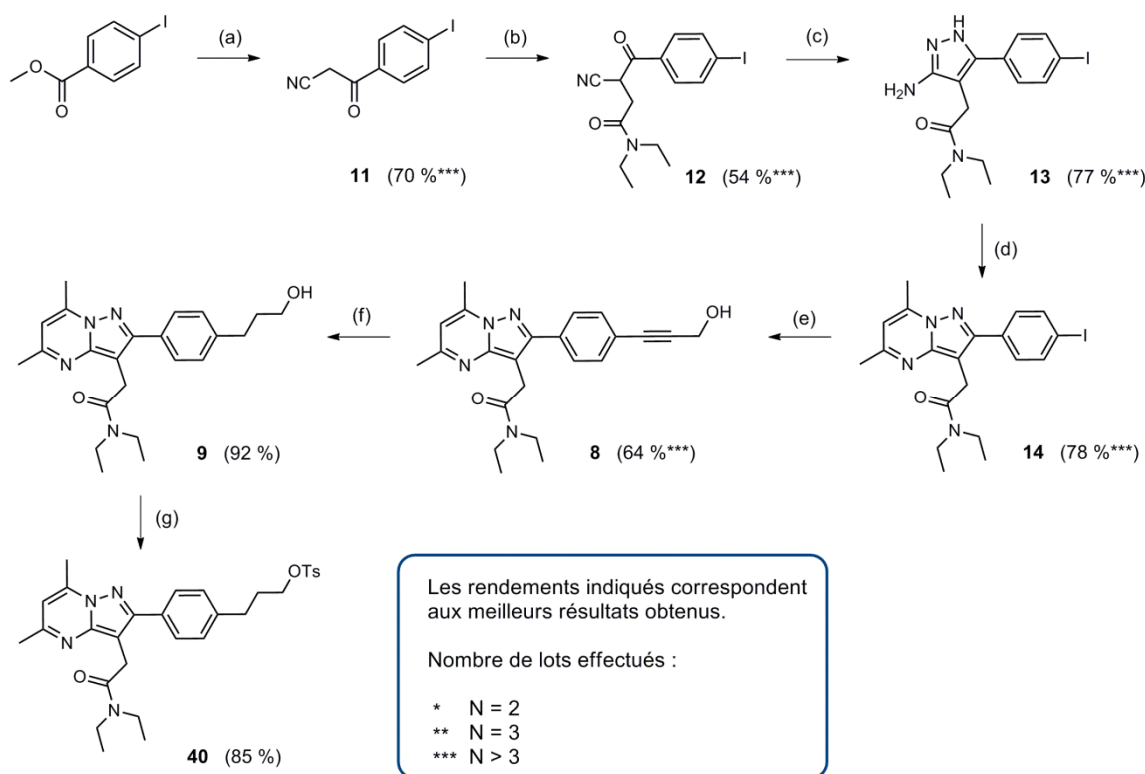


Schéma 76. Voie d'obtention du précurseur de radiomarquage de [^{18}F]CfO-DPA-714.

5.2.3. Résultats obtenus pour la synthèse du précurseur de marquage de [^{18}F]CfO-DPA-714

La deuxième stratégie de synthèse des analogues alcanes (**Schéma 37**, section 1.3.3) a été réutilisée pour préparer l'alcool **9** (**Schéma 77**). Cette stratégie ayant déjà été discutée (section

1.3.2), elle ne sera pas de nouveau détaillée ici. L'alcool **9** a ensuite été tosylé par le chlorure de tosyloxy en présence de triéthylamine dans le DCM à t.a. pendant 16 h. Le précurseur de marquage du [^{18}F]CfO-DPA-714 (**40**) a ainsi été obtenu avec un très bon rendement de 85 %, soit un rendement global de 8 % sur 7 étapes. Contrairement au précurseur de marquage en série alcyne **39**, l'utilisation de chlorure de tosyloxy n'a pas posé de problèmes particuliers tels que la formation d'un dérivé chloré.



Réactifs et conditions: (a) i. *n*-BuLi, CH₃CN, THF, -60 °C, 30 min - ii. 4-iodobenzoyl méthyle, -60 °C, 1 h puis -45 °C, 2 h ; (b) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, t.a., 4 j ; (c) N₂H₄·H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 3 h ; (d) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 5 h ; (e) 2-propyn-1-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, t.a., 72 h ; (f) H₂ 1 atm, Pd/C 10 %, MeOH, t.a., 72 h ; (g) TsCl, TEA, DCM, 0 °C à t.a., 16 h.

Schéma 77. Schéma de synthèse du précurseur de radiomarquage de [^{18}F]CfO-DPA-714 (**40**).

5.3. Série phényle

5.3.1. Stratégies de synthèse du précurseur de marquage de [^{18}F]F-DPA

Quatre stratégies de synthèse de précurseurs de marquage de [^{18}F]F-DPA, faisant chacune intervenir les « building-block » I-DPA (**14**) ou DPA-OTf (**33**), ont été envisagées (**Figure 27**). Chaque stratégie mène à un type de précurseur codé DPA-X dans lequel X est un groupement partant pouvant subir une substitution nucléophile (S_NAr) ou électrophile (S_EAr). A noter que

l'analogue fluorophényle F-DPA peut théoriquement servir de précurseur de radiomarquage. Cependant, les RAS obtenues pour un échange $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ sont généralement faibles c'est pourquoi le radiomarquage direct de F-DPA n'a pas été envisagé dans ce travail. Au final, les quatre classes de précurseurs sur lesquelles ont porté les recherches sont:

- Les dérivés trialkylétain **DPA-SnR₃** (S_EAr)
- Les sels d'iodonium **DPA-I⁺-Ph, X⁻** (S_NAr)
- Les dérivés nitrés **DPA-NO₂** (S_NAr)
- Les sels d'ammonium quaternaire **DPA-NMe₃⁺, X⁻** (S_NAr)

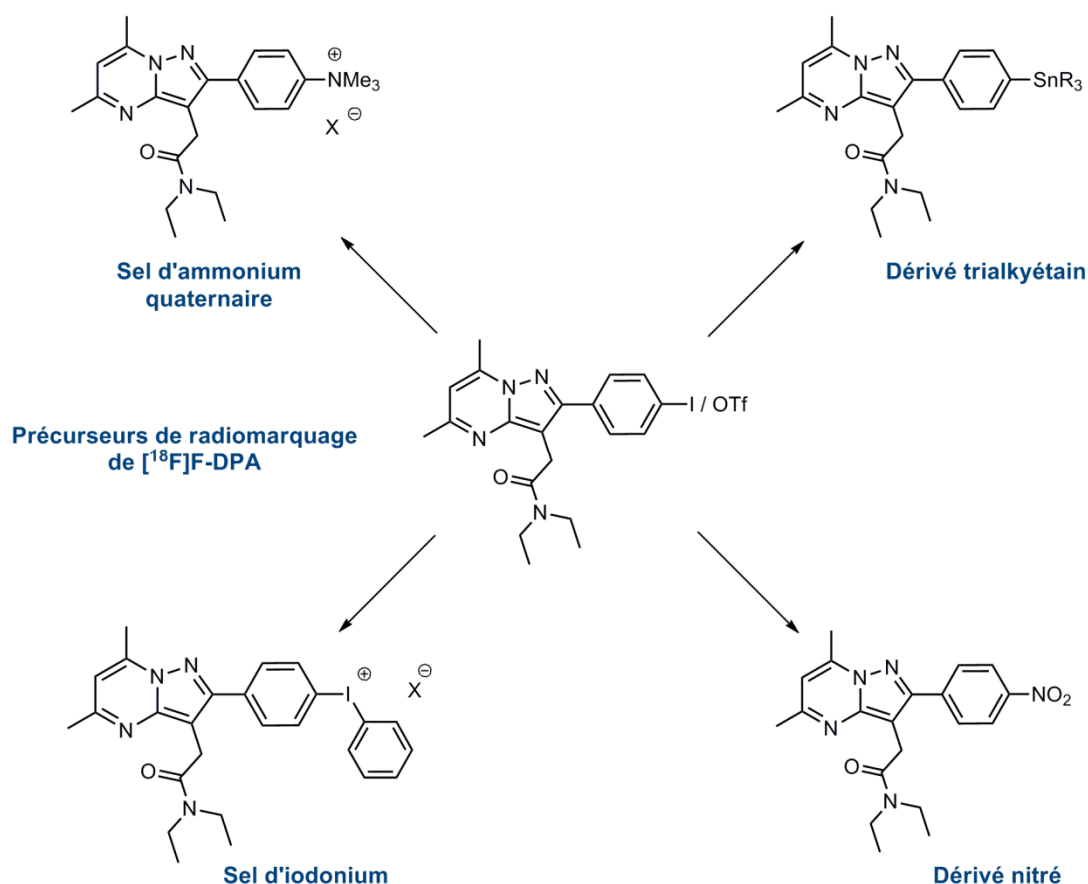


Figure 27. Précurseurs de radiomarquage envisagés pour $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$.

5.3.2. Résultats obtenus pour le précurseur de marquage nitré

Historiquement, la nitration des composés aromatiques était réalisée avec le mélange sulfonitrique à basse température mais la mauvaise régiosélectivité et les conditions réactionnelles très acides, incompatibles avec certains groupements fonctionnels, ont encouragé le développement d'autres réactifs. Saito *et al.* ont par exemple rapporté la préparation de nitroaryles par action du nitrite de sodium sur des dérivés iodés en présence d'éthers

couronnes.¹¹⁵ Récemment, des nitrations pallado-catalysées sur des chlorures d'aryle, des triflates et des nonaflates ont été développées par Fors *et al.*¹¹⁶ Cette dernière méthode a été choisie pour la synthèse du précurseur nitré car elle bénéficie d'une excellente tolérance des groupements fonctionnels et le triflate de départ avait déjà été synthétisé au laboratoire à partir de DPA-713. De cette façon, en chauffant à 80 °C le composé **33** dans le *tert*-butanol en présence de nitrite de sodium, de Pd₂(dba)₃, du ligand ^tBuBrettPhos et de tris[2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl]amine (TDA), le dérivé nitré **41** a été obtenu avec un rendement de 33 % comme illustré sur le **Schéma 78**. La préparation de ce précurseur a été délicate en raison de sa co-élution dans la plupart des éluants chromatographiques avec le triflate de départ. Néanmoins, ils peuvent être discernés avec le système Et₂O/MeOH 97,5/2,5 (v/v), bien que la chromatographie sur gel de silice soit difficile. Par ailleurs, la conversion n'est jamais complète (50 % au maximum) et rend la purification du produit difficile. Toutefois, il a été possible d'isoler le précurseur nitré **41** après trituration dans le diéthyléther car DPA-OTf (**33**) reste en solution alors que le produit désiré précipite.

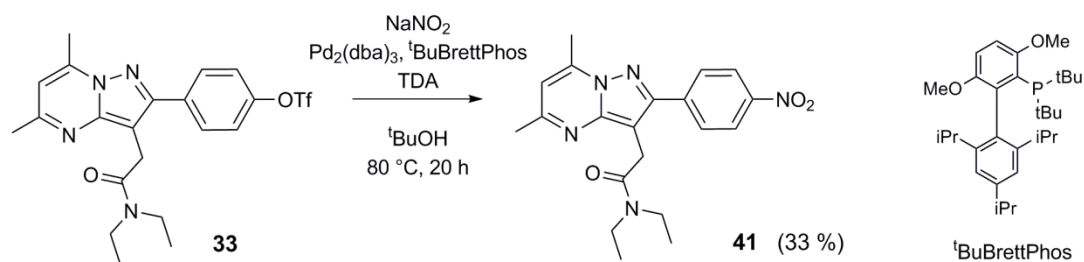


Schéma 78. Synthèse du précurseur nitro **41** à partir du triflate **33** par couplage au palladium.

La structure du précurseur de marquage a ensuite été rapidement confirmée par RMN ¹H en comparant les spectres obtenus avec ceux du triflate de départ. En RMN ¹H, il a été observé un important saut du déplacement chimique vers les grandes fréquences (7,35 à 8,30 ppm) pour les protons en *ortho* du nitro tandis que ceux en *meta* ont été peu affectés (8,00 à 8,12 ppm). En RMN ¹³C, il a été observé la disparition du quadruplet à 118,7 ppm, caractéristique du motif CF₃ du triflate, au profit d'un pic à 144,8 ppm qui correspond au déplacement attendu pour un carbone sp² portant un groupement nitro.

5.3.3. Résultats obtenus pour le précurseur de marquage trialkylétain

Les dérivés aryltrialkylétain peuvent être synthétisés de différentes façons. On peut notamment citer l'action des organomagnésiens sur des dérivés stannylés tels que le chlorure de tributylétain (Stoermer *et al.*¹¹⁷), les substitutions sur des vinylsulfones par l'hydrure de tributylétain en présence d'AIBN (Watanabe *et al.*¹¹⁸) ou sur des énols triflés par action de l'hexabutyldiétain (Gilbertson *et al.*¹¹⁹). Comme illustré dans le **Schéma 79**, la méthode qui a

¹¹⁵ S. Saito, Y. Koizumi. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 4715.

¹¹⁶ B. P. Fors, S. L. Buchwald. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16, 12898.

¹¹⁷ M. J. Stoermer, J. T. Pinhey. *Molecules*, **1998**, 3, M67.

¹¹⁸ Y. Watanabe, Y. Ueno, T. Araki, T. Endo, M. Okawara. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 215.

¹¹⁹ S. R. Gilbertson, C. A. Challener, M. E. Bos, W. D. Wulf. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4795.

été choisie pour préparer le tributylstannane **42** fait intervenir un couplage de Stille entre l'hexabutyldiétain et le composé I-DPA **14** en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ dans le toluène à 110 °C pendant 2 h. Le dérivé **42** a été obtenu avec un rendement de 40 %. D'autre part, l'utilisation de l'hexabutyldiétain en excès (2 eq) a posé des problèmes lors de la purification car ce composé est co-élué dans la plupart des éluants chromatographiques.

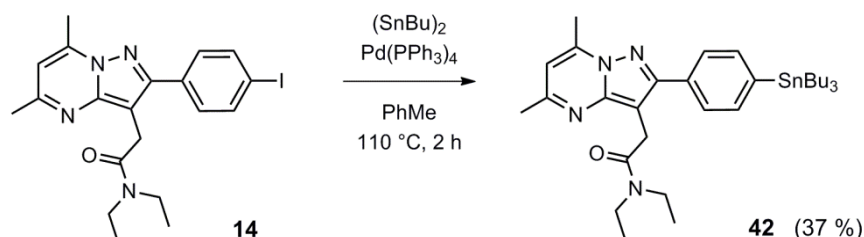


Schéma 79. Synthèse du précurseur stannylé **42** par couplage de Stille avec l'hexabutyldiétain.

Néanmoins, une pureté correcte pour le dérivé stannylé **42** a pu être obtenue après plusieurs chromatographies successives et en utilisant la triéthylamine à hauteur de 1 % dans l'éluant. La structure du stannane **42** a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C avec notamment la présence de pics satellites caractéristiques. Ces pics correspondent aux couplages avec les protons et les atomes de carbone à proximité de l'atome d'étain car les isotopes ^{119}Sn (8,7 % en abondance naturelle) et ^{117}Sn (7,1 %) possèdent tous deux un spin de 1/2.¹²⁰

5.3.4. Résultats obtenus pour le précurseur iodonium

Les sels d'aryliodonium peuvent être obtenus de différentes façons. Un mode d'obtention assez répandu fait intervenir des dérivés aryltrialkylétain. Un premier essai a donc été réalisé en faisant réagir le stannane **42** avec le [hydroxy(tosyloxy)iodo]benzène, plus connu sous le nom de réactif de Koser (commercial), dans le DCM à t.a. pendant 1 h d'après une procédure décrite par Pike *et al.*¹²¹ (**Schéma 80**).

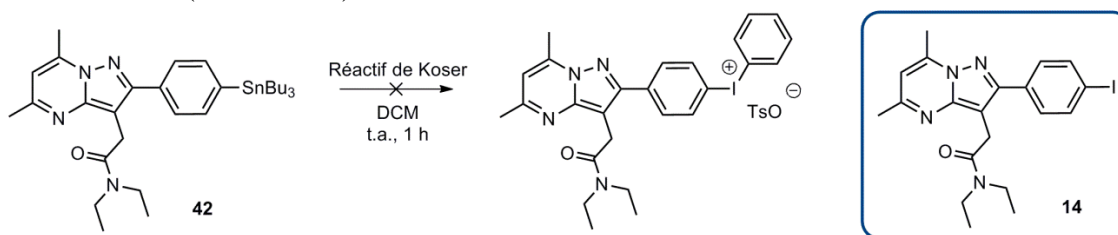


Schéma 80. Essai de synthèse du précurseur iodonium à partir du dérivé stannylé **42**.

Cependant, le produit isolé n'a pas été le sel d'iodonium attendu, comme l'a confirmé l'analyse RMN ^1H , mais le composé I-DPA (**14**). Les recherches se sont ensuite orientées vers une méthode utilisée par Bielawski *et al.* et mettant en jeu l'oxydation d'iodoarènes par le *m*-CPBA

¹²⁰ H. J. Reich, J. P. Borst, M. B. Coplien, N. H. Phillips. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6577.

¹²¹ S. Telu, J. H. Chun, F. G. Siméon, S. Lu, V. W. Pike. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 6629.

suivie d'un couplage avec des acides boroniques.¹²² Comme illustré dans le **Schéma 81**, le composé **14** a ainsi été mis en présence de *m*-CPBA et du complexe BF₃.Et₂O dans le DCM pendant 30 min à t.a. avant de rajouter de l'acide phénylboronique au milieu réactionnel et de laisser réagir à 0 °C pendant 15 min. Un solide a été recueilli par filtration à l'issue de la réaction.

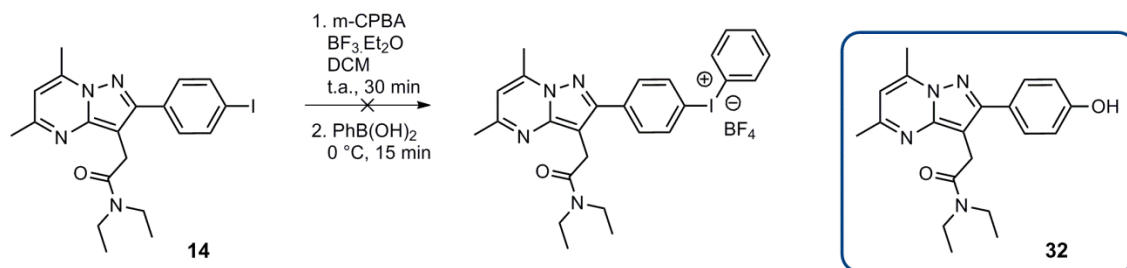


Schéma 81. Essai de synthèse du précurseur iodonium à partir de I-DPA (**14**).

Le spectre RMN ¹H de ce solide comportait quatre protons aromatiques sortant sous la forme de deux doublets caractéristiques d'un cycle benzénique *para*-disubstitué. Néanmoins, le nombre de protons aromatiques et la multiplicité des signaux observés ne correspondaient pas avec la structure du sel d'iodonium visé. Par ailleurs, il a été remarqué la présence d'un singulet très large entre 5 et 5,5 ppm suggérant la formation du DPA-OH (**32**). Après comparaison des spectres RMN ¹H, il s'est avéré que c'est effectivement ce composé qui s'est principalement formé au cours de la réaction. Dans leur étude, Bielawski *et al.* ont également rapporté la formation de produits secondaires sans toutefois préciser lesquels.¹²² Il est possible qu'il s'agisse dans notre cas de produits de type *N*-oxyde qui ont la particularité de ne pas toujours être visibles lors de l'analyse en CCM (du fait de leur co-elution possible avec le produit de départ). Ces résultats non concluant ont encouragé le développement d'un autre type de précurseur: les sels d'ammonium quaternaire.

5.3.5. Résultats obtenus pour le précurseur de marquage ammonium quaternaire

5.3.5.1. Synthèse à partir de I-DPA

Les sels d'ammonium sont généralement obtenus par méthylation d'une amine tertiaire. Pour cela on utilise des agents méthylants tels que le sulfate de méthyle (CH₃)₂SO₄, le triflate de méthyle CF₃SO₃Me ou l'iodure de méthyle CH₃I. Etant donné leur caractère ionique, il est fréquent que les sels d'ammonium quaternaires précipitent dans le milieu réactionnel lors de leur formation, ce qui facilite leur isolement. Dans la rétrosynthèse du sel d'ammonium présentée dans le **Schéma 82** apparaît un dérivé diméthylaniline qu'il a été envisagé de synthétiser par un couplage de Buchwald-Hartwig sur I-DPA (**14**).

¹²² M. Bielawski, D. Aili, B. Olofsson. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4602.

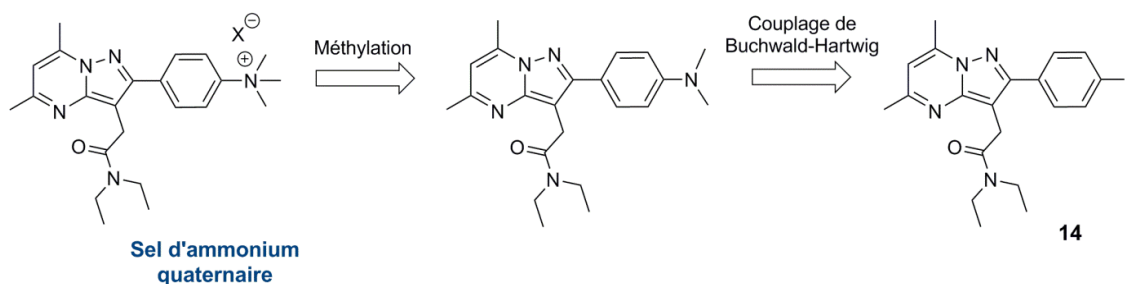


Schéma 82. Rétrosynthèse du précurseur de marquage ammonium quaternaire.

Pour optimiser ce couplage d'un iodoaryle avec la diméthylamine, un criblage des conditions opératoires (base, catalyseur, ligand, solvant, température) a été réalisé en reprenant les travaux de Wolfe *et al.* (**Tableau 11**).^{123,124}

Exp.	Amine	Eq.	Catalyseur	Ligand	Base	Solvant	T (°C)
1	NHMe ₂ /THF	1,2	Pd(OAc) ₂	dppp	^t BuOK	PhMe	75
2	NHMe ₂ /THF	2,4	Pd ₂ (dba) ₃	P(<i>o</i> -tolyl) ₃	NaO ^t Bu	dioxane	100
3	NHMe ₂ .HCl	1,1	CuI	-	K ₂ CO ₃	DMF	150
4	NHMe ₂ .HCl	20	Pd(OAc) ₂	dppp	^t BuOK (20 eq)	PhMe	75
5	NHMe ₂ .HCl	20	Pd ₂ (dba) ₃	P(<i>o</i> -tolyl) ₃	^t BuOK (20 eq)	dioxane	100

Tableau 11. Criblage des conditions optimales pour le couplage de Buchwald-Hartwig sur I-DPA.

Cette étude a eu pour objectif de passer en revue des conditions opératoires variées en un minimum de temps, c'est pourquoi plusieurs paramètres (catalyseur, ligand, base, solvant, température) ont été modifiés simultanément d'une expérience à l'autre. Dans les expériences 1 et 2, l'amine utilisée est la diméthylamine en solution dans le THF. Aucune conversion n'a été observée dans les deux cas. Cela peut être dû à la volatilité de l'amine, d'autant plus qu'elle n'a pas été introduite en large excès, c'est pourquoi le chlorhydrate a été utilisé à la place dans les autres essais. L'amination de l'expérience 3 présente l'intérêt d'être catalysée par l'iodure de cuivre I qui est nettement plus abordable que les catalyseurs au palladium (conditions d'Ullmann¹²⁵). Cette réaction nécessite cependant de hautes températures (150-200 °C) qui ne sont visiblement pas adaptées au substrat car la décomposition a été décelée en CCM. En ce qui concerne l'expérience 4, l'amination a été réalisée à 75 °C dans le toluène en présence d'acétate de palladium et d'un large excès (20 eq) de chlorhydrate et de base (^tBuOK) afin de favoriser la réaction. Ces conditions n'ont pas fonctionné car une multitude de produits secondaires ont été formés. Dans le cas de l'expérience 5, aucune conversion n'a été observée après 2 h de réaction. Globalement, l'amination de Buchwald-Hartwig n'a pas fonctionné avec I-DPA. Les recherches se sont poursuivies par un essai de couplage de Stille sur un aminostannane commercial illustré dans le **Schéma 83**. Koza *et al.* sont parvenus à synthétiser une grande

¹²³ S. Wagaw, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7240.

¹²⁴ J. P. Wolfe, S. L. Buchwald. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1133.

¹²⁵ M. Sugahara, T. Ukita. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45, 719.

variété de 7-aminotétracyclines *N,N*-disubstituées avec des rendements s'échelonnant de 35 à 78 % avec une méthode similaire¹²⁶.

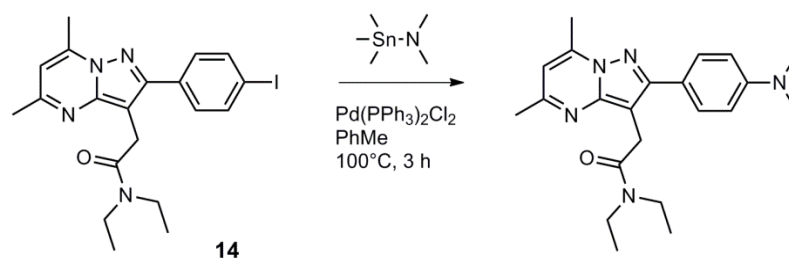


Schéma 83. Essai de couplage de I-DPA avec un aminostannane commercial.

La réaction a été réalisée en présence de 2 % de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ et de 1.2 eq d'aminostannane. Après 3 h à 100 °C, le suivi CCM a montré que I-DPA est entièrement consommé et qu'un nouveau produit légèrement plus polaire se forme. L'analyse RMN ^1H a mis en évidence un composé différent du produit attendu: le changement de multiplicité des protons suggère que le cycle benzénique n'est plus *para*-disubstitué. Par ailleurs, aucun signal relatif aux deux groupements méthyle portés par l'azote n'est présent sur le spectre. L'hypothèse la plus plausible semble être le remplacement de l'atome d'iode de I-DPA par un hydrogène, ce qui explique d'ailleurs le faible écart de R_f avec le produit de départ.

5.3.5.2. Synthèse à partir d'une amine commerciale

Etant donné que les couplages avec I-DPA n'ont pas donné de résultats concluants, les recherches se sont orientées vers la mise au point d'une synthèse du sel d'ammonium à partir d'un cétonitrile commercial ayant déjà le groupement diméthylamino à la position souhaitée comme exposé dans le **Schéma 84**.

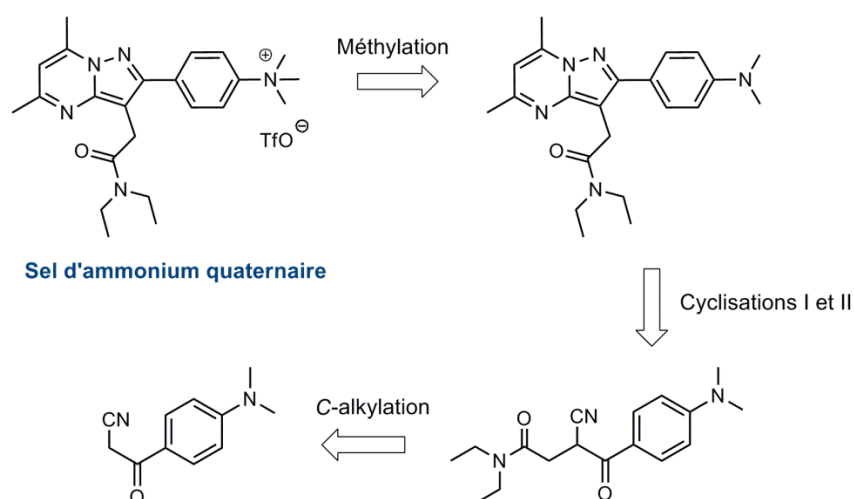
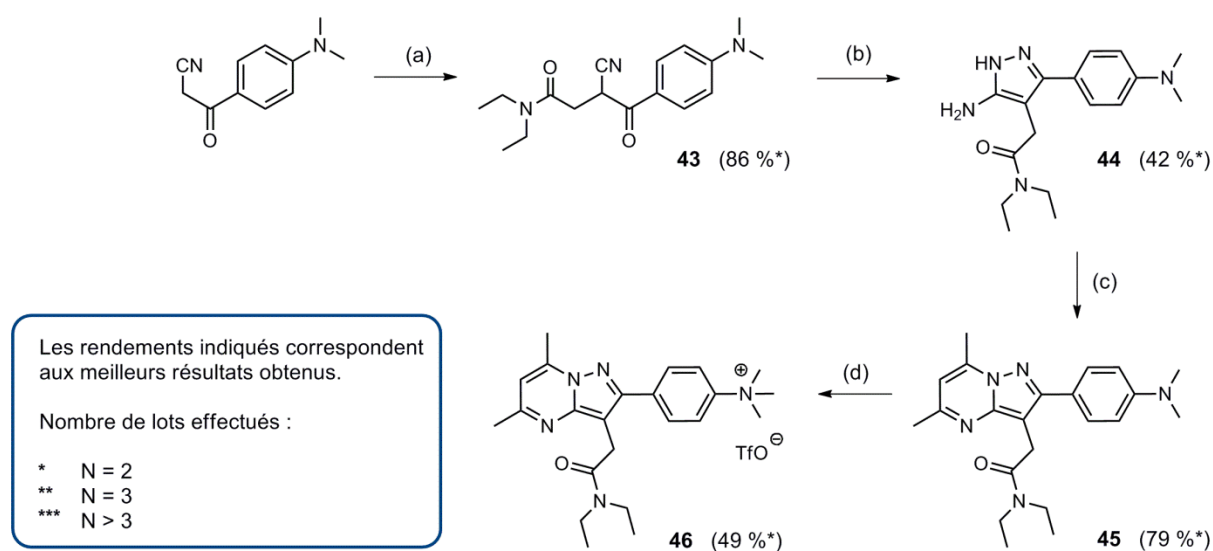


Schéma 84. Rétrosynthèse du sel d'ammonium quaternaire faisant apparaître un cétonitrile commercial.

¹²⁶ D. J. Koza, Y. A. Nsiah. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 5025.

Avec cette approche, la molécule-cible a pu être synthétisée avec succès en seulement 4 étapes comme exposé dans le **Schéma 85**. La stratégie est assez classique en ce qui concerne la construction du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine puisqu'elle fait intervenir la réaction de C-alkylation (étape a) et les deux cyclisations habituelles (étapes b et c). Cette séquence a globalement bien fonctionné sauf la cyclisation avec l'hydrazine (étape b) qui a fourni le pyrazole **44** avec un rendement modeste de 42 %. Le dérivé **45** a été obtenu avec un bon rendement de 79 % et une grande pureté par simple trituration du brut dans le diéthyldéther. La dernière étape de la séquence a consisté à méthyler le motif diméthylamino pour former le sel d'ammonium quaternaire. Cela a été réalisé avec le triflate de méthyle dans le toluène à température ambiante. Après 15 min, le triflate de triméthylammonium **46** a précipité sous la forme d'une poudre jaune clair très fine, ce qui a facilité son extraction et sa purification par lavages successifs au diéthyldéther. Le sel **46** a été obtenu avec un rendement moyen de 49 %.



Réactifs et conditions: (a) i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, t.a., 48 h ; (b) N₂H₄.H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 7 h ; (c) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 6 h ; (d) CF₃SO₃CH₃, PhMe, t.a., 15 min.

Schéma 85. Schéma de synthèse du sel d'ammonium quaternaire **46**.

6. Radiomarquage au fluor-18

6.1. Présentation du module de radiosynthèse TRACERLab FX N Pro

Le module de radiosynthèse TRACERLab FX N Pro (**Figure 28**) est un dispositif commercialisé par la société GE Healthcare, filiale du groupe américain General Electric. Il permet de préparer des radiotraceurs marqués au fluor-18 de manière entièrement automatisée. Ce dispositif est placé dans une enceinte ventilée et blindée au plomb (**Figure 29**) limitant ainsi l'exposition des opérateurs à la radioactivité. Ses dimensions sont d'environ 50x50x50 cm pour un poids de 20 kg. Il est équipé d'un réacteur cylindrique en « glassy carbon » de diamètre 20

mm et d'un réacteur conique en verre borosilicaté de diamètre 9 mm. Chaque réacteur est connecté à 5 ou 6 flacons destinés à contenir les réactifs nécessaires à la radiosynthèse. La circulation des fluides dans des tuyaux en téflon se fait par aspiration au moyen de pompe ou pression positive d'hélium. Ce module de radiosynthèse est capable de chauffer jusqu'à 200 °C et est équipé d'un système de refroidissement à l'air comprimé.



Figure 28. Le TRACERLab FX N Pro.



Figure 29. Cellule blindée.

6.2. Radiomarquage de [^{18}F]DPA-C5yne

[^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) a été radiomarqué au fluor-18 au laboratoire à partir du précurseur tosylé **39** présenté dans le **Schéma 86**. Deux conditions réactionnelles ont été étudiées, toutes deux considérées comme classiques en radiochimie du fluor-18 : 160 °C/5 min et 100 °C/10 min. Lorsque le milieu est chauffé pendant 5 minutes à 160 °C, l'incorporation du fluor-18 est très faible. Cela est confirmé par le fait que la majeure partie de la radioactivité est retenue sous forme d'ions fluorures n'ayant pas réagi et qui sont fixés sur la cartouche d'alumine au moment de la pré-purification, avant l'injection en HPLC. En revanche, si le milieu est chauffé pendant 10 minutes à 100 °C, un rendement radiochimique en [^{18}F]-**16c** de 20-25 % (deux essais) corrigé de la décroissance est obtenu.

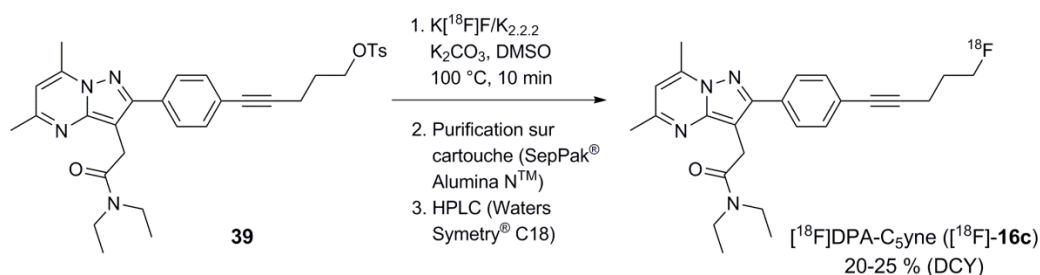


Schéma 86. Radiosynthèse de [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**).

Une fois la réaction de radiofluoruration proprement dite terminée, il faut dans un premier temps séparer le radioligand [^{18}F]DPA-C5yne des ions fluorures [^{18}F]F $^-$ n'ayant pas réagi. Pour cela, le brut réactionnel est pré-purifié en l'éluant sur une colonne d'alumine SepPak® Alumina N™ qui a la propriété de piéger les composés très polaires tels que $^{18}\text{F}^-$ ou K^+ mais de laisser passer les composés plus apolaires, dont le radioligand [^{18}F]DPA-C5yne. Ensuite, une HPLC sur une

colonne Waters Symmetry® C18 permet d'isoler [^{18}F]-**16c** (temps de rétention : 9,8 minutes) avec une pureté chimique supérieure à 90 %. Il était donc important de connaître avec exactitude le temps de rétention du radiotraceur afin de collecter spécifiquement le [^{18}F]DPA-C5yne. C'est précisément le rôle de la référence froide (ligand non radioactif), dont le temps de rétention est identique à sa contre-partie marquée au fluor-18. On pourra noter que sur le radiochromatogramme (**Figure 30**, en haut), un pic supplémentaire, non identifié, est présent juste avant celui du radioligand [^{18}F]DPA-C5yne (temps de rétention : 8,8 minutes). De même, de nombreux pics sont observés sur le chromatogramme UV (**Figure 30**, en bas). Ces pics correspondent très certainement à des produits issus de la dégradation du précurseur de marquage ou à de produits formés lors de réaction secondaires. Aucun de ces pics n'a cherché à être identifié à ce stade du développement du radiotraceur.

La référence froide permet ainsi de savoir que le pic à collecter sort à 9,8 minutes. La dernière étape de la synthèse est la formulation qui permet de remplacer l'éluant HPLC, non compatible avec une administration *in vivo*, par un mélange d'éthanol et de sérum physiologique. Cette étape est primordiale étant donné que les préparations radiopharmaceutiques peuvent être injectées à l'homme dans le cadre d'essais cliniques à l'issue de phases d'évaluation préclinique.

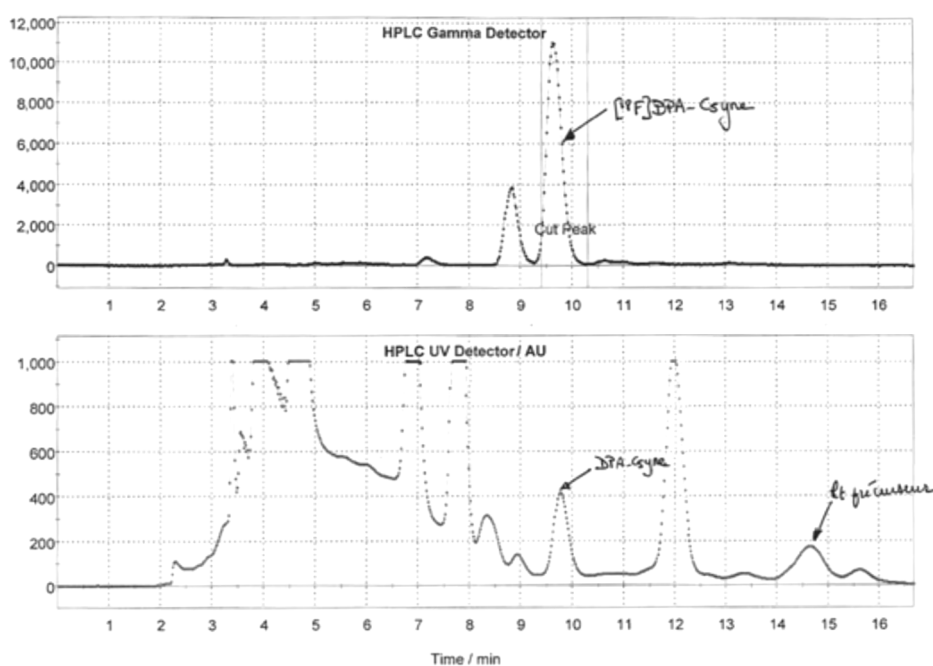


Figure 30. Chromatogrammes obtenus lors de la purification de [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**).
Détection gamma (en haut) ou UV (en bas).

Une fois le radiotraceur collecté, son activité est mesurée pour déterminer le rendement radiochimique (EOS) ainsi que l'activité spécifique. Dans le cas de [^{18}F]DPA-C5yne, l'activité mesurée était comprise entre 4,3 et 5,2 GBq et sa radioactivité spécifique (RAS) s'échelonnait entre 55 et 110 GBq/ μmol . La durée totale de la radiosynthèse était de 50-60 minutes (purification et formulation incluses).

6.3. Radiomarquage de [^{18}F]CfO-DPA-714

Le radiotracer [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) a été préparé avec succès au laboratoire selon la procédure décrite dans le **Schéma 87**.¹²⁷ A noter que même si les conditions opératoires employées pour la radiofluoruration (5 minutes à 160 °C) étaient plus sévères que pour le précurseur alcyne, cela n'a pas eu d'incidence négative sur l'incorporation du fluor-18. En effet, [^{18}F]CfO-DPA-714 a été obtenu avec un rendement radiochimique de l'ordre de 25-30 % (DCY), ce qui était même mieux que celui obtenu pour le [^{18}F]DPA-C5yne [^{18}F]-**16c**. Ainsi, en partant de 30 GBq d'ions fluorures [^{18}F]F⁻ produits par le cyclotron, entre 7,5 et 9,0 GBq de l'activité initiale ont été convertis en [^{18}F]CfO-DPA-714 dont la pureté radiochimique était supérieure à 99 % et la radioactivité spécifique comprise entre 50 et 90 GBq/ μmol .

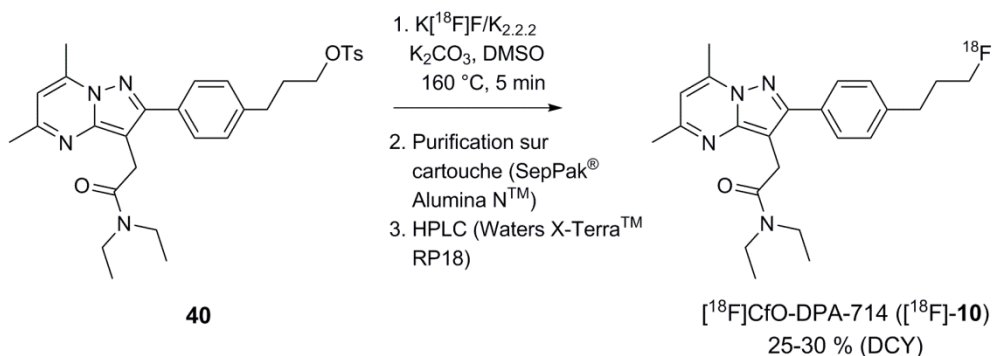


Schéma 87. Radiosynthèse de [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**).

7. Autoradiographie *in vitro* et imagerie TEP *in vivo*

7.1. Série alcyne

7.1.1. Autoradiographie *in vitro* de [^{18}F]DPA-C5yne

Les autoradiographies *in vitro* de [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) a été réalisées sur des rats Wistar sept jours après avoir induit une lésion excitotoxique du striatum droit par l'acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque (AMPA). Ce modèle animal, qui simule l'inflammation des pathologies neurodégénératives, a été validé par des analyses immunohistochimiques¹²⁸ et utilisé pour les évaluations *ex vivo* des radiotraceurs [^{11}C]PK11195, [^{11}C]CLINME, [^{11}C]DPA-713, [^{18}F]PBR111, [^{18}F]DPA-714, [^{11}C]SSR180575^{129,130,131,132}. Les autoradiographies de la **Figure 31** ont été effectuées avec le radiotracer seul [^{18}F]DPA-C5yne (7,4 nM) dans l'expérience A ou en présence de l'analogue DPA-C5yne **16c** (20 μM) dans l'expérience B, du PK11195 (20 μM , le ligand de référence de

¹²⁷ A. Damont, A. S. C. Ching, V. Médran-Navarrete, B. Kuhnast, H. Gaudy, F. Dollé. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2011**, 54, S1-S461.

¹²⁸ H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominiaux, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, M. James, S. Jan, V. Brulon, Y. Fontyn, R. Trébossen, P. Hantraye, F. Dollé, B. Tavitian, M. Kassiou. *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 573.

¹²⁹ N. Van Camp, R. Boisgard, B. Kuhnast, B. Thézé, T. Viel, M.-C. Grégoire, F. Chauveau, H. Boutin, A. Katsifis, F. Dollé, B. Tavitian. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2010**, 37, 962.

¹³⁰ H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominiaux, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, S. Jan, V. Brulon, Y. Fontyn, R. Trébossen, P. Hantraye, F. Dollé, B. Tavitian, A. Katsifis. *Glia*, **2007**, 55, 1459.

¹³¹ F. Chauveau, N. Van Camp, F. Dollé, B. Kuhnast, F. Hinnen, A. Damont, H. Boutin, M. L. James, M. Kassiou, B. Tavitian. *J. Nucl. Med.* **2009**, 50, 468.

¹³² F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, C. Thominiaux, P. Hantraye, L. Rivron, F. Marguet, M.-N. Castel, T. Rooney, J. Benavides, F. Dollé, B. Tavitian. *J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2011**, 38, 509.

TSPO 18 kDa) dans l'expérience C ou du Flumazénil (20 μ M, ligand du CBR) dans l'expérience D afin de confirmer la sélectivité et la spécificité de [18 F]DPA-C5yne pour la protéine TSPO 18 kDa.

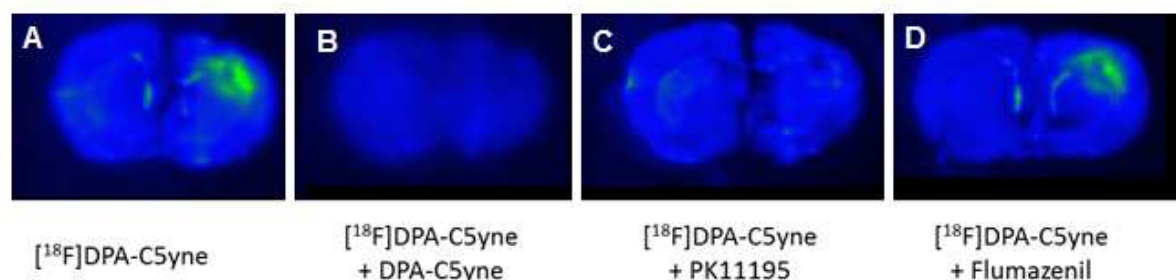


Figure 31. Autoradiographies *in vitro* sur coupes de cerveaux de rats lésés à l'AMPA et incubés avec [18 F]DPA-C5yne ([18 F]-**16c**) (7,4 nM) seul (A) ou avec DPA-C5yne **16c** (20 μ M) (B), PK11195 (20 μ M) (C) ou avec le Flumazénil (20 μ M) (D).

L'expérience A a montré que le radiotracer se fixait préférentiellement dans la zone lésée (à droite) par rapport à la zone contrôle (à gauche). Le « target-to-background ratio » (TBR), qui compare la concentration du radiotracer dans la zone lésée à celle dans la zone contrôle (aussi appelée zone contralatérale), était assez peu élevé, $1,9 \pm 0,3$ ($p < 0,0001$) et plus bas que celui de [18 F]DPA-714 qui était de $5,4 \pm 2,0$ ($p < 0,001$). L'addition d'un excès de DPA-C5yne non radiomarquée **16c** ou de PK11195 (20 μ M soit 2700 fois plus que de [18 F]DPA-C5yne) a complètement inhibé la fixation du radiotracer sur la protéine TSPO 18 kDa (expériences B et C) ce qui a démontré la haute spécificité de [18 F]DPA-C5yne pour la protéine TSPO 18 kDa. Par ailleurs, l'ajout de Flumazénil (20 μ M), un ligand du CBR (« Central Benzodiazepine Receptor ») n'a pas affecté le binding du radioligand puisque le TBR s'est maintenu à $1,9 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$) (expérience D). Cela a prouvé la sélectivité de [18 F]DPA-C5yne ([18 F]-**16c**) pour la protéine TSPO 18 kDa vis-à-vis des récepteurs centraux.

7.1.2. Imagerie TEP *in vivo* de [18 F]DPA-C5yne

Les études d'imagerie *in vivo* ont été effectuées avec un tomographe dédié au petit animal (Inveon PET/CT, Siemens) sur des rats Wistar (N = 3) anesthésiés à l'isoflurane et présentant des lésions induites par l'AMPA (stéréotaxie pratiquée sept jours avant l'imagerie TEP) (**Figure 32.A**). Sur l'image TEP, la lésion de la zone ipsilatérale (indiquée par le curseur blanc) était visible à partir de 5 min après l'injection intra-veineuse du radiotracer [18 F]DPA-C5yne ([18 F]-**16c**) et jusqu'à la fin de l'acquisition de l'image. Un contraste relativement important a été observé entre la zone lésée et la zone contralatérale. L'accumulation de [18 F]DPA-C5yne dans le striatum lésé était également assez élevée (0,24 % de la dose injectée par millilitre (% ID/mL) à 60 min, **Figure 32.B**) mais légèrement plus basse que celle de [18 F]DPA-714 (0,30 % ID/mL pour la même durée). Cependant, l'accumulation du radiotracer dans la zone contralatérale (zone non lésée) était elle aussi significativement plus basse (0,05 % ID/mL à 60 min). En d'autres termes, cela signifie que le ratio des concentrations en [18 F]DPA-C5yne dans les zones ipsilatérales et contralatérales était meilleur que celui de [18 F]DPA-714. Au

niveau des valeurs expérimentales, ce ratio était de $4,62 \pm 0,40$ ($p < 0,0001$) pour [^{18}F]DPA-C5yne contre $3,71 \pm 0,40$ ($p < 0,001$) pour le [^{18}F]DPA-714. A titre de comparaison, le ratio mesuré pour le ligand de référence, [^{11}C]PK11195, n'est que de $1,65 \pm 0,20$ ($p < 0,001$).

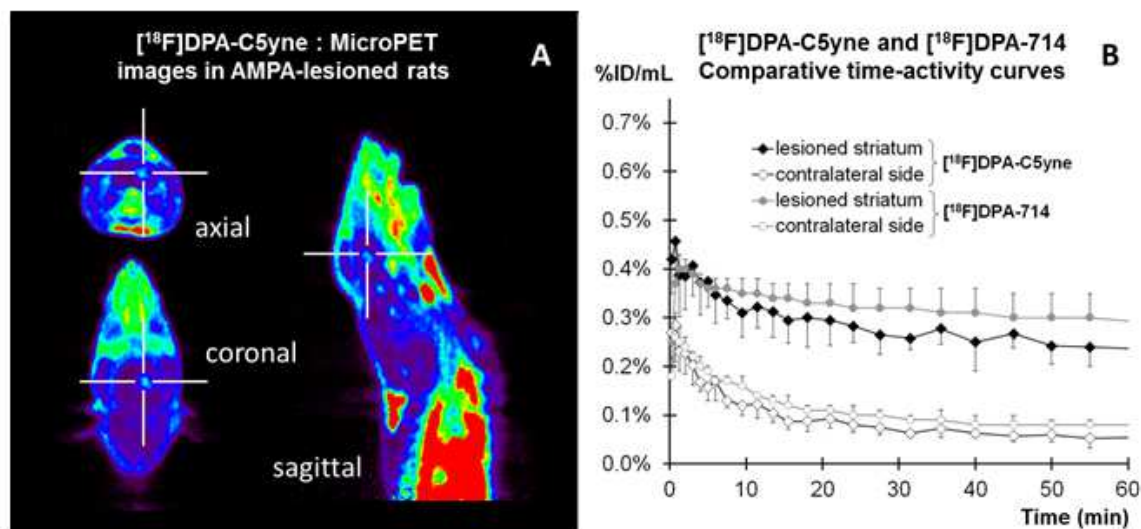


Figure 32. (A) Images microPET axiales, coronales et sagittales obtenues entre 5 et 60 minutes après injection *i.v.* de [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) dans un rat. Le curseur blanc indique l'emplacement de la lésion cérébrale causée par l'AMPA sur le côté droit pour chaque coupe. (B) Courbes comparatives de l'activité de [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) et de [^{18}F]DPA-714 en fonction du temps dans les zones lésées et dans les zones témoins (contralatérales). Les valeurs indiquées sont exprimées en pourcentage de la dose injectée par millilitre (% ID/mL) en fonction du temps (min).

7.2. Série alcane

7.2.1. Autoradiographie *in vitro* de [^{18}F]CfO-DPA-714

Les autoradiographies *in vitro* de [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) ont été réalisées de la même façon qu'avec le radiotracer [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**). Pour rappel, une lésion excitotoxique du striatum gauche a été induite par l'AMPA sept jours avant l'injection du radiotracer (**Figure 33**).

Dans l'expérience A, seul le [^{18}F]CfO-DPA-714 était incubé et l'on a observé une forte accumulation du radiotracer dans la zone ipsilatérale à gauche (zone lésée). Le TBR de [^{18}F]CfO-DPA-714 mesuré au cours de cette expérience était le même que celui de [^{18}F]DPA-714, à savoir $5,4 \pm 2,0$, ce qui était une valeur très satisfaisante. Dans l'expérience B, la version non radiomarquée du traceur, CfO-DPA-714 **10** (20 μM), a été ajoutée au bain d'incubation ce qui a engendré l'extinction du signal radioactif. Cette expérience a mis en évidence le caractère réversible de la fixation de [^{18}F]CfO-DPA-714 sur la protéine TSPO 18 kDa. De même, l'addition de PK11195 (ligand de référence de TSPO 18 kDa) à la même concentration a complètement déplacé [^{18}F]-**10**, ce qui s'est traduit par une extinction du signal radioactif (expérience C). En revanche, l'addition de Flumazénil à 20 μM (ligand des récepteurs CBR) n'a pas eu d'effet sur la fixation du radiotracer (expérience D) ce qui a démontré la sélectivité du radiotracer [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) envers la TSPO 18kDa.

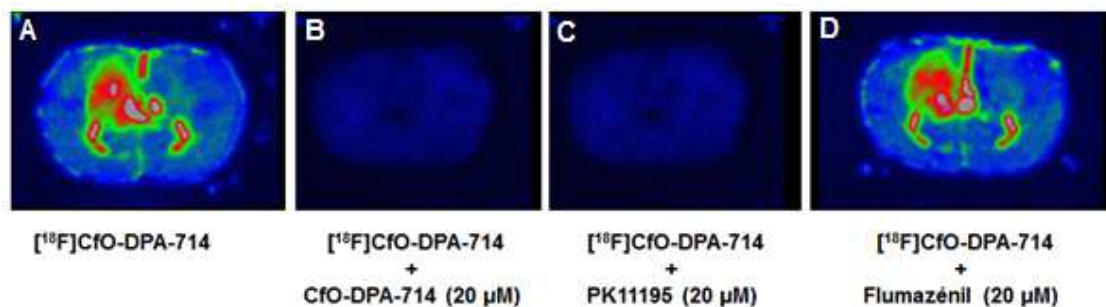


Figure 33. Autoradiographies *in vitro* sur coupes de cerveaux de rat lésés à l'AMPA et incubés avec $[^{18}\text{F}]\text{CfO-DPA-714}$ ($[^{18}\text{F}]\text{-10}$) (7,4 nM) seul (A) ou avec CfO-DPA-714 **10** (20 μM) (B) ou avec le PK11195 (20 μM) (C) ou avec le Flumazénil (20 μM) (D).

7.2.2. Imagerie TEP *in vivo* de $[^{18}\text{F}]\text{CfO-DPA-714}$

Les études d'imagerie *in vivo* avec $[^{18}\text{F}]\text{CfO-DPA-714}$ ($[^{18}\text{F}]\text{-10}$) ont été réalisées avec un tomographe du petit animal (Inveon PET/CT, Siemens) de la même façon qu'avec le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{DPA-C5yne}$ ($[^{18}\text{F}]\text{-16c}$). Les images indiquent que l'accumulation de $[^{18}\text{F}]\text{CfO-DPA-714}$ (**Figure 34**) dans le striatum lésé était légèrement plus élevée qu'avec le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ (0,32 % contre 0,30 % ID/mL à 60 min) et nettement plus élevées qu'avec le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-C5yne}$ (0,24 % ID/mL à 60 min). En revanche, l'accumulation de $[^{18}\text{F}]\text{CfO-DPA-714}$ dans la zone contralatérale (zone non lésée) était plus élevée que celle de $[^{18}\text{F}]\text{DPA-C5yne}$ (0,08 % contre 0,05 % ID/mL à 60 min). Le ratio des concentrations en $[^{18}\text{F}]\text{CfO-DPA-714}$ dans les zones ipsilatérales et contralatérales reste légèrement supérieur ($3,74 \pm 0,46$) à celui de $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ ($3,71 \pm 0,40$) mais est inférieur à celui de $[^{18}\text{F}]\text{DPA-C5yne}$ ($4,62 \pm 0,40$).

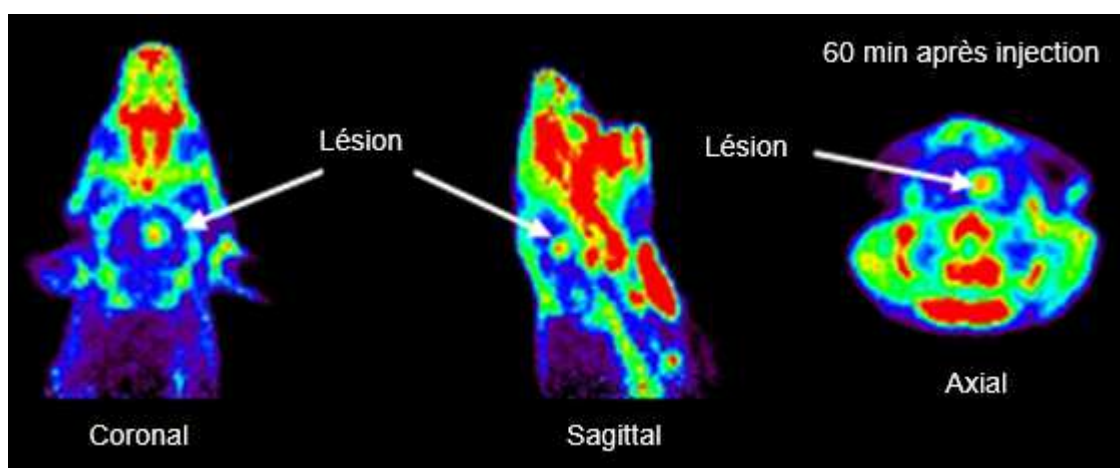


Figure 34. Images microPET en coupe coronale, sagittale et axiale obtenues entre 5 et 60 minutes après injection *i.v.* de $[^{18}\text{F}]\text{CfO-DPA-714}$ ($[^{18}\text{F}]\text{-10}$) dans un rat. La flèche blanche indique l'emplacement de la lésion cérébrale causée par l'AMPA.

Chapitre 2: Dérivés de CfO-DPA-714 modifiés au niveau de la fonction amide

Dans un deuxième temps, il a été envisagé de préparer des analogues amides de CfO-DPA-714. Ce chapitre vise à détailler les recherches qui ont faites en ce sens.

1. Analogues amides

1.1. Cibles synthétiques

Les cibles synthétiques envisagées dans cette série, baptisée « série amide », sont des analogues obtenus par dérivatisation de la fonction amide de CfO-DPA-714 (**10**), la chaîne fluorée latérale étant toujours la même (fluoropropyl). Le choix de CfO-DPA-714 s’est fait sur la base de ses bonnes propriétés physico-chimiques (stabilité, lipophilie), pharmacologiques (K_i pour la TSPO 18 kDa) ainsi que de sa facilité d’obtention. Au total, une dizaine de composés, dont les structures sont illustrées dans la **Figure 35**, ont été considérés pour cette série.

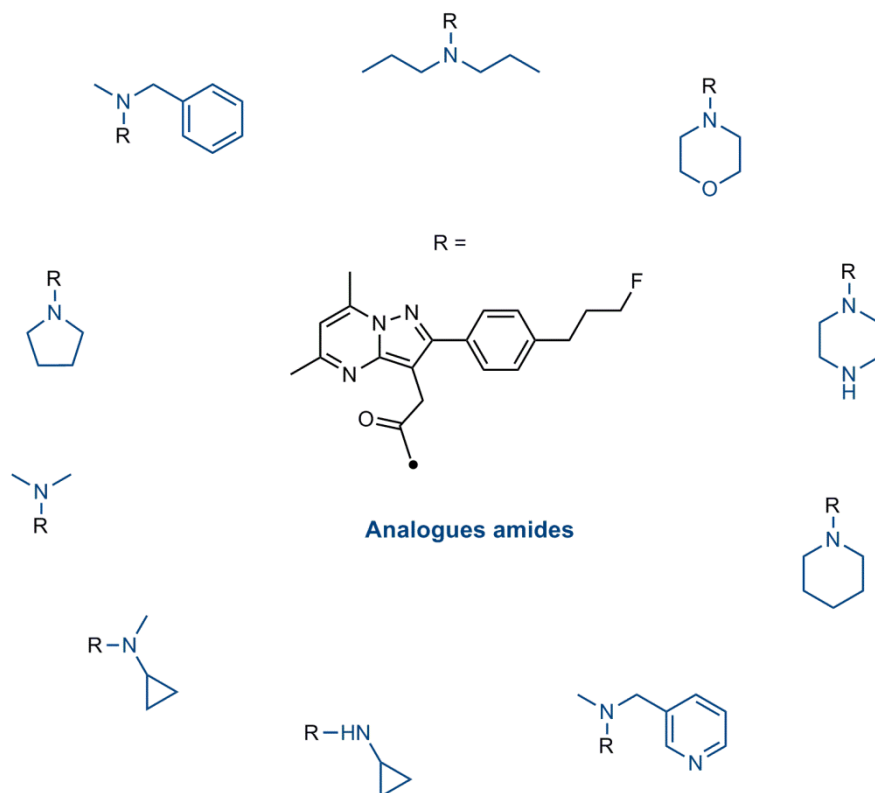


Figure 35. Structures des analogues amides ciblés.

1.2. Stratégie de synthèse des analogues amides

L'analyse rétrosynthétique des analogues amides exposée dans le **Schéma 88** fait apparaître comme intermédiaire-clé un dérivé ester qui permettrait de synthétiser tous les analogues de la série amide. Il est intéressant de remarquer que la dérivatisation de cet ester est la dernière étape de la séquence réactionnelle. La stratégie envisagée a donc un fort potentiel synthétique puisqu'elle permet d'accéder en une seule étape à partir de cet intermédiaire commun à une grande variété d'amides.

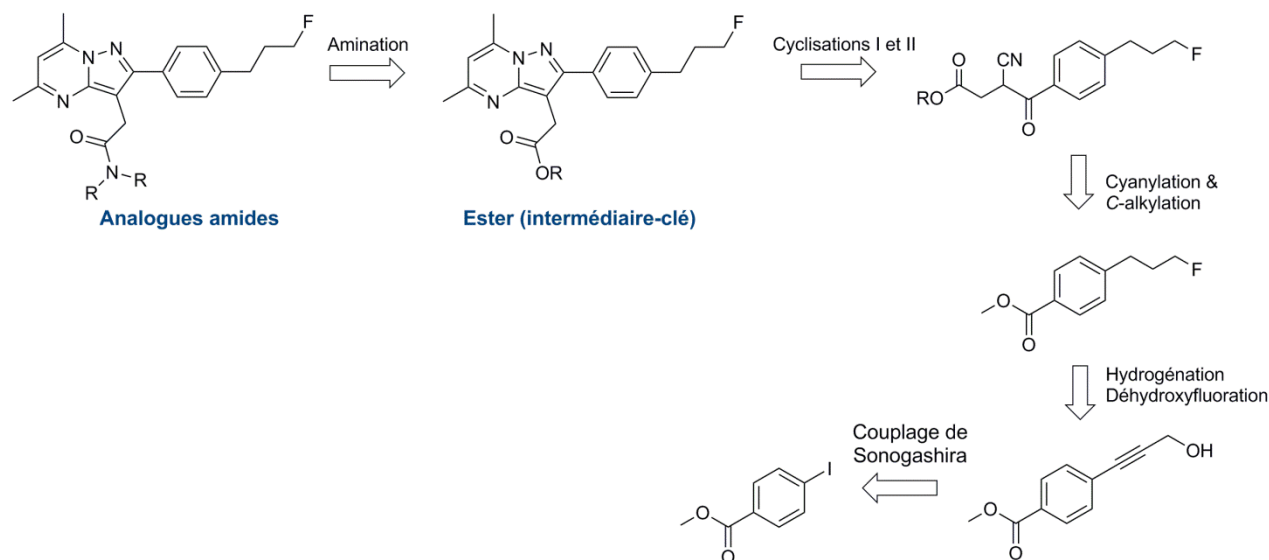


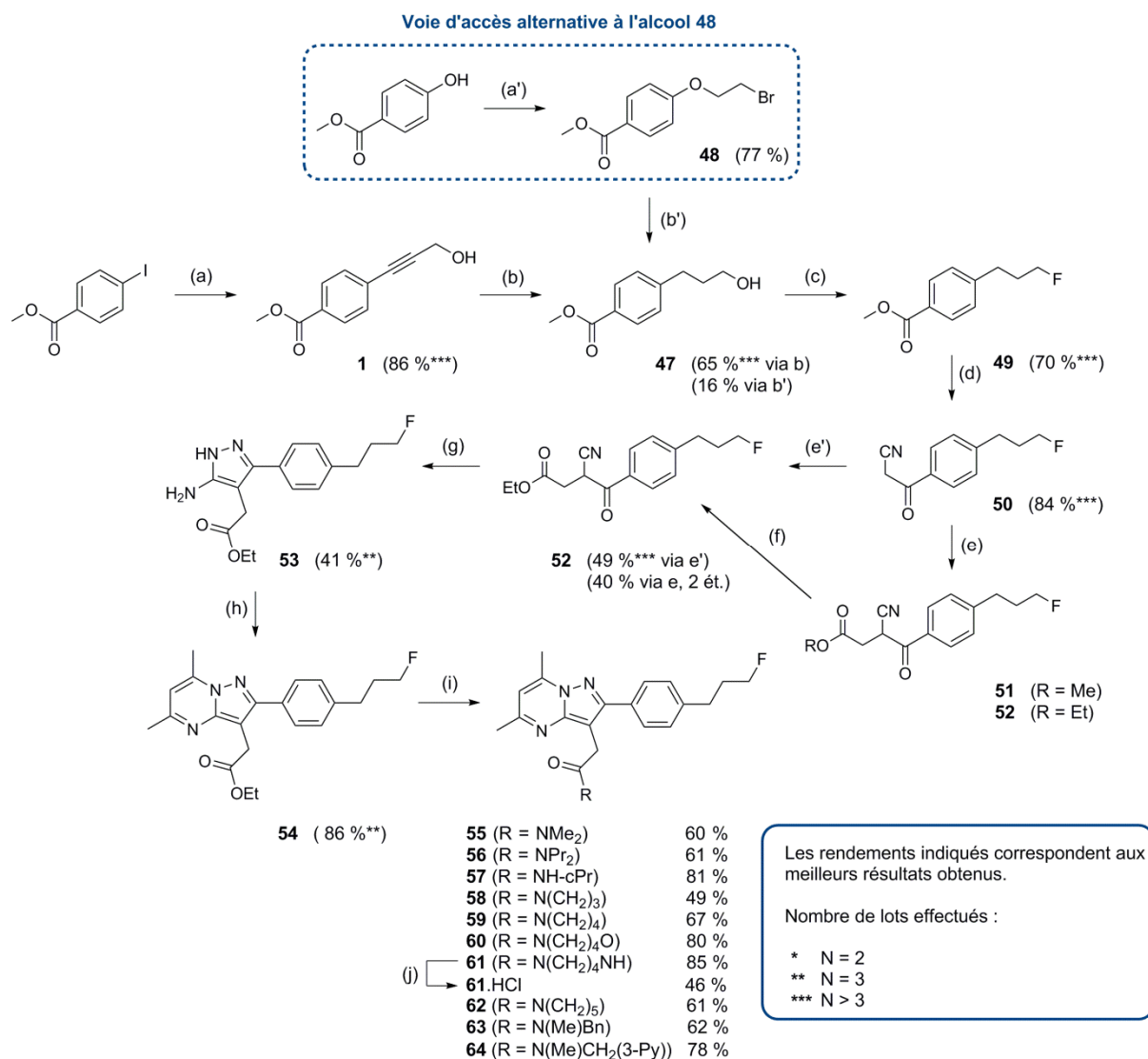
Schéma 88. Rétrosynthèse des analogues amides.

Le dérivé ester pourrait être obtenu grâce à la méthodologie classique de construction du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine avec quelques modifications. Ainsi, l'étape de C-alkylation fait ici intervenir un α -haloester à la place du chloroacétamide habituel afin d'incorporer la fonction ester requise avant l'amination finale.

Par ailleurs, dans cette série, la chaîne latérale fluoropropyle pourrait être introduite en début de séquence réactionnelle par exemple par couplage de Sonogashira suivi d'une hydrogénation et d'une déhydroxyfluoruration de l'alcool propargylique **1**.

1.3. Résultats obtenus pour la stratégie de synthèse des analogues amides

Conformément à la stratégie initiale, un couplage de Sonogashira suivi d'une hydrogénation catalytique de l'alcool propargylique **1** ont permis d'obtenir rapidement l'alcool **47** avec un rendement de 56 % sur deux étapes comme indiqué dans le **Schéma 89**. Néanmoins, une voie d'accès alternative à l'alcool **47** (en pointillé bleu) a été explorée en parallèle.



Réactifs et conditions: (a) prop-1-yn-3-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, t.a., 72 h ; (b) H₂ 1 atm, Pd/C 10 %, MeOH, 72 h ; (a') 1,3-dibromopropane, K₂CO₃, acétone, 12 h, 50 °C ; (b') Bu₃SnH, AIBN, PhMe, 110 °C, 6 h ; (c) Deoxofluor®, DCM, 12 h, 0 °C à t.a. ; (d) *n*-BuLi, CH₃CN, THF, -60 °C, 30 min - ii. **49**, -60 °C, 15 min puis -45 °C, 30 min ; (e) i. K₂CO₃, EtOH, t.a., 10 min - ii. BrCH₂CO₂Me, NaI, t.a., 48 h ; (f) EtOH, Zn, PhMe, 100 °C, 4 h ; (e') i. NaOH, EtOH, t.a., 15 min - ii. BrCH₂CO₂Et, NaI, t.a., 7 j ; (g) N₂H₄.H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 2 h ; (h) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 5 h ; (i) i. amine, AlMe₃, PhMe, t.a., 1 h - ii. **54**, 70 °C ou 100-110 °C, 30 min-1 h ; (j) 1.25 M HCl.MeOH, DCM, t.a., 5 min.

Schéma 89. Schéma de synthèse des analogues amides **55** à **64**.

Cette seconde voie comporte également deux étapes :

La première est une *O*-alkylation du 4-hydroxybenzoate de méthyle avec le 1,3-dibromopropane à chaud et en milieu basique. L'éther désiré **48** a été isolé avec un bon rendement de 77 %. Cependant, il s'est aussi formé environ 20 % d'un adduit dialkylé (structure confirmée par RMN ¹H) résultant de la double substitution du 1,3-dibromopropane par les groupements phénolates de l'ester. Bien que le 1,3-dibromopropane ait été introduit en excès (3 eq) par rapport au phénol, cette double alkylation n'a pas été complètement annihilée. Il aurait probablement été possible de limiter la formation de l'adduit dialkylé en diluant

davantage le milieu réactionnel et en engageant davantage de 1,3-dibromopropane. Dans la deuxième étape, le phénoxyéther **48** est engagé dans une réaction d'isomérisation radicalaire catalysée par AIBN et faisant intervenir l'hydruure de tributylétain au reflux dans le toluène. Cette réaction, apparentée à une substitution *ipso* intramoléculaire, permet d'obtenir l'alcool **47** avec un rendement de 16 %. Ce faible rendement est dû au fait que le réarrangement intramoléculaire n'est pas la réaction principale. En effet, Eun *et al.*¹³³ ont démontré en 1993 que dans ces conditions et à partir du composé **48**, le produit majoritaire (65 %) est le dérivé arylpropyléther résultant d'une déhalogénéation, l'alcool **47** se formant à hauteur de 25 % seulement. Ils ont également mis en évidence que la proportion d'alcool formé varie en fonction des substituants en *ortho* et *para* comme cela est résumé dans le **Schéma 90**. Ainsi, elle est de seulement 25 % lorsque le substituant est un groupement ester méthylique en *para* mais peut s'élever à 53 % lorsqu'il s'agit d'un groupement méthoxy en *ortho* et même atteindre 90 % avec en plus une fonction aldéhyde en *para*. Par ailleurs, dans ce dernier cas de figure, seul l'alcool est formé ce qui signifie que la substitution *ipso* intramoléculaire devient la réaction prépondérante (sélectivité totale).

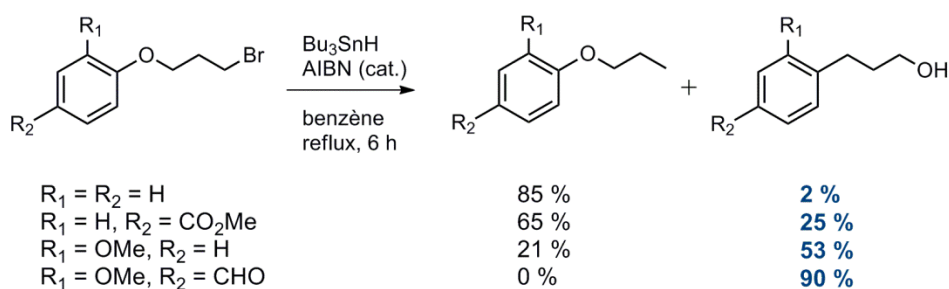


Schéma 90. Influence des substituants *ortho* et *para* sur la substitution *ipso* intramoléculaire.¹³⁴

Il est intéressant de noter que la présence de groupements électro-donneurs (EDG) tels que OMe et dans une moindre mesure de groupements électro-attracteurs (EWG) sur le cycle, facilite l'attaque *ipso* et donc la formation de l'alcool primaire. Comme indiqué sur le **Schéma 91**, la substitution *ipso* passe par un intermédiaire spiro bicyclique pseudoaromatique dont la formation résulte de l'attaque d'une liaison π du cycle benzénique sur le radical au bout de la chaîne propyle. Cette réaction est d'autant plus favorisée que la liaison π est riche en électrons c'est pourquoi le groupement en *ortho* a une grande influence. La seconde partie du mécanisme fait intervenir l'ouverture du cycle oxygéné par la rupture homolytique de la liaison $C_{\text{spiro}}-O$ engendrant le retour à l'aromaticité du cycle benzénique.

¹³³ L. Eun, L. Chulbom, S. T. Jin, S. W. Ho, S. L. Kap. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2343.

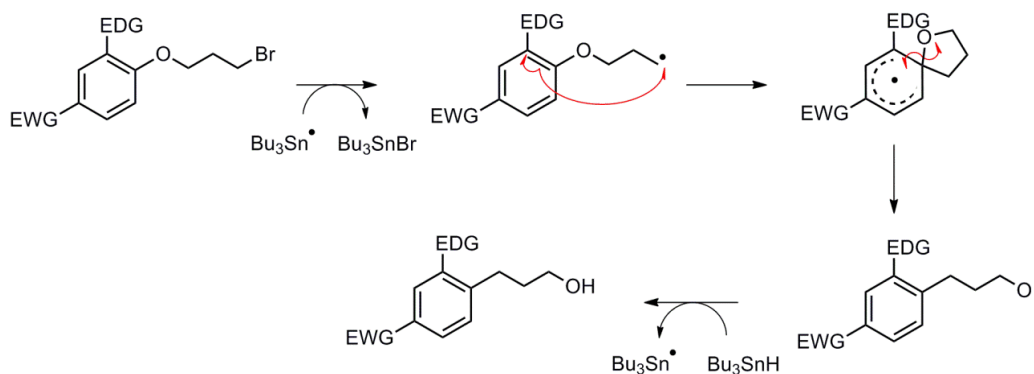


Schéma 91. Mécanisme proposé pour la substitution *ipso* intramoléculaire.

Le rendement de synthèse combiné de l'alcool **47** sur les étapes a' et b' est bien inférieur à celui obtenu *via* le couplage de Sonogashira, c'est pourquoi seule cette dernière méthode a finalement été retenue et employée pour générer une quantité suffisante d'alcool **47**. L'alcool **47** a ensuite été engagé dans une réaction de déhydroxyfluoruration avec du Deoxofluor[®] qui s'est très bien déroulée puisque la réaction a été totale et n'a pas généré de produits secondaires, d'où le bon rendement de 70 % en dérivé fluoré **49**. La réaction de cyanylation (étape d) a permis d'obtenir le nitrile **50** avec un bon rendement de 84 % et une pureté suffisante pour passer directement à l'étape de C-alkylation. Celle-ci a initialement été effectuée avec le bromoacétate de méthyle dans l'éthanol en présence d'une base différente de NaOH pour éviter une éventuelle saponification de l'ester. A cette fin, deux bases ont été testées: la triéthylamine et le carbonate de potassium (1,1 eq dans les deux cas). La première difficulté rencontrée a concerné le suivi CCM de la réaction qui n'a pas été évident en raison de la co-élution du nitrile **50** avec l'ester méthylique **51** dans la plupart des éluants couramment utilisés au laboratoire (DCM/MeOH, heptane/AcOEt, toluène/acétone, DCM/acétone). Finalement le système chromatographique le plus satisfaisant s'est avéré être un mélange d'éther de pétrole et de diéthyldéther 50:50 v/v. Avec la triéthylamine, l'ester attendu (méthylique) s'est formé en majorité mais l'ester éthylique **52**, résultant de la transestérification du produit avec l'éthanol, a également été identifié. Avec le carbonate de potassium, le cas de figure inverse a été observé : le produit majoritaire s'est révélé être l'ester éthylique **52**.

Au départ, la réaction de transestérification a plutôt été considérée comme un problème du fait de la formation de deux produits non séparables. Il aurait été facile d'éviter cette réaction secondaire en remplaçant l'éthanol par du méthanol. Toutefois, la transestérification s'est révélée être utile en permettant une meilleure séparation chromatographique du composé **52**. En effet, alors que l'ester méthylique **51** est pratiquement inséparable du nitrile de départ **50**, l'ester éthylique **52**, qui est moins polaire, se distingue nettement en CCM. Comme il n'était pas nécessaire d'avoir un ester méthylique pour l'amination finale (étape i), il a donc été entrepris de tirer parti de la transestérification pour former exclusivement l'ester éthylique **52** et ainsi améliorer la séparation chromatographique. Un troisième essai a ainsi été réalisé en

utilisant le bromoacétate de méthyle et K_2CO_3 dans l'éthanol. A l'issue de la réaction, le nitrile **50** a été entièrement consommé mais la transestérification n'a pas été complète et un mélange inséparable d'esters méthylique **51** et éthylique **52** a été obtenu.

Il a alors été décidé de trouver des conditions opératoires permettant de convertir complètement l'ester méthylique **51** en ester éthylique **52**. La première tentative a été effectuée en chauffant à 80 °C le mélange d'esters dans l'éthanol sous catalyse acide (HCl 37 %) mais un produit unique, vraisemblablement issu de l'hydrolyse du nitrile, a été obtenu à la place. Une seconde tentative, cette fois-ci dans le toluène à 110 °C avec environ 90 eq d'éthanol et en présence de 1 eq de zinc en poudre ($< 10 \mu m$), a permis de complètement convertir l'ester méthylique **51** au bout de 4 h (étape f). Le rendement cumulé de 40 % sur les étapes e et f suggère que la transestérification catalysée par le zinc a été très efficace puisque le rendement des C-alkylations est typiquement de l'ordre de 35-45 %. Bien qu'elle soit indirecte, cette voie d'obtention de l'ester éthylique **52** s'est révélée donc être tout à fait acceptable.

Par la suite, l'ester **52** a été obtenu par voie directe à partir de **50** avec un rendement supérieur (49 %) en utilisant le bromoacétate d'éthyle commercial (étape e'). Le composé **54**, qui est l'intermédiaire-clé de cette stratégie, a été obtenu après les deux cyclisations consécutives g et h avec un rendement global de 7 % sur 7 étapes. Il s'agit d'un rendement satisfaisant puisqu'il a été possible d'isoler 2,1 g d'ester **54** à partir d'une vingtaine de grammes seulement de 4-iodobenzoate de méthyle. A titre de comparaison, la synthèse des analogues alcynes et alcanes (6 à 7 étapes) a nécessité une cinquantaine de grammes de cet iodoester. L'étape finale de la séquence réactionnelle a consisté à dérivatiser le composé **54** par amination afin de préparer les dix analogues amides ciblés. Lors du premier essai, la préparation du composé **56** a été entreprise par amination de l'ester **54** avec la dipropylamine (2 eq) à 45 °C dans le THF en présence de DBU (1,8-diazabicyclo [5.4.0]undéc-7-ène) sur la base des travaux de Price *et al.*¹³⁴ sur l'amination des cyanoacétates. Aucune conversion n'a été observée après 48 h à 40 °C. Le second essai d'amination a été effectué en faisant réagir directement la dipropylamine en excès (3 eq) dans l'éthanol à 80 °C. Là encore, la réaction n'a pas fonctionné et ce, même en rajoutant 6 eq supplémentaires d'amine. Un autre essai a été entrepris en employant un très large excès de méthylamine (55 eq) en solution aqueuse à 40 % cette fois pour générer le composé **55** mais il s'est révélé infructueux. Finalement, les recherches se sont orientées vers l'amination assistée par le triméthylaluminium qui a été rapportée pour la synthèse d'amides à partir d'esters.^{135,136,137} Cette réaction passe par la formation d'un complexe diméthylaluminium amide qui réagit avec l'ester dans des conditions douces pour générer le carboxamide correspondant comme présenté dans le **Schéma 92**.

¹³⁴ K. E. Price, C. Larrivé-Aboussafy, B. M. Lillie, R. W. McLaughlin, J. Mustakis, K. W. Hettenbach, J. M. Hawkins, R. Vaidyanathan. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2003.

¹³⁵ D. R. Sidler, T. C. Lovelace, J. M. McNamara, P. J. Reider. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1231.

¹³⁶ A. Basha, M. Lipton, S. M. Weinreb. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 48, 4171.

¹³⁷ J. I. Levin, E. Turos, S. M. Weinreb. *Synth. Commun.* **1982**, 12, 989.

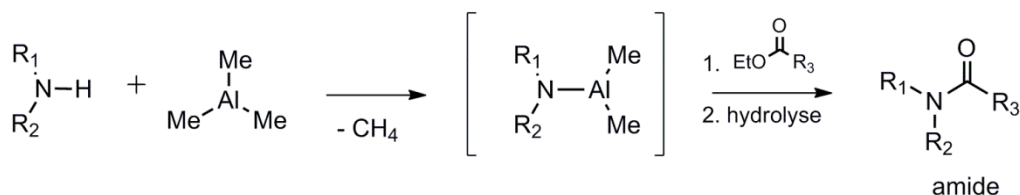


Schéma 92. Formation d'amides par action du triméthylaluminium sur des esters.

Lorsque cette réaction a été appliquée à la synthèse des analogues amides, il a été nécessaire de laisser réagir l'amine avec AlMe_3 pendant 1 h dans le toluène à t.a. puis d'ajouter l'ester **54** et de chauffer à 100 °C (70 °C dans le cas de l'analogue azétidine **58**). De cette façon, neuf analogues amides (**55-64**) ont été préparés avec des rendements globalement satisfaisants variant de 49 % pour le dérivé azétidine **58** à 85 % pour le dérivé pipérazine **61**. En plus de ces bons rendements, cette méthode présente l'avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre. Le traitement post-réactionnel est également facilité car les sels d'aluminium et l'amine de départ résiduelle sont aisément éliminés par un lavage acide. A noter que des précautions particulières ont été prises pour la préparation de l'amide azétidine **58**. En effet, cet hétérocycle à quatre chaînons est soumis à de fortes contraintes conformationnelles c'est pourquoi il a tendance à se dégrader très facilement en cas de chauffage trop important. Ainsi, il est crucial que la température du milieu réactionnel ne dépasse pas 70 °C lors de la synthèse. De même, le traitement acide habituel ne convient pas pour ce composé car l'ouverture du cycle azétidine semble également favorisée en conditions acides. L'hydrolyse a donc été effectuée à pH neutre et l'hydroxyde d'aluminium formé a été éliminé par filtration sur fritté. Par précaution, la purification par chromatographie sur gel de silice a été évitée en raison du caractère légèrement acide de la phase stationnaire. La trituration dans le diéthyléther a permis d'obtenir l'amide **58** avec une pureté au moins égale à 95 % (RMN ^1H) et suffisante pour les tests *in vitro*. En ce qui concerne l'analogue pipérazine **61**, un produit de pureté supérieur a été obtenu par formation du chlorhydrate correspondant **61.HCl**. Ce sel a été préparé par ajout à t.a. de HCl (1,25 M dans MeOH) à une solution de **61** dans le DCM pendant 5 min.

1.4. Cas particulier de l'analogue *N*-méthylcyclopropylamine

L'analogue *N*-méthylcyclopropylamine n'est pas directement accessible par amination de l'ester **54** car l'amine nécessaire n'est pas commerciale. Comme présenté dans le **Schéma 93**, la synthèse de cet analogue a dans un premier temps été envisagée par *N*-méthylation de l'analogue cyclopropylamine **57**. Celui-ci a d'abord subi une déprotonation par l'hydruide de sodium puis l'amidure résultant a été méthylé par l'iodométhane (1,1 eq) dans le DMF à t.a.

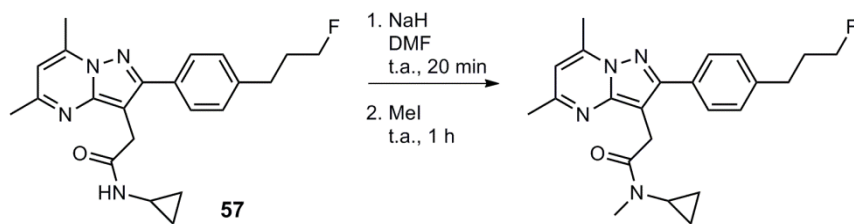


Schéma 93. Essai de méthylation de l'analogue cyclopropylamine **55** par l'iodométhane.

Cependant, cette réaction s'est révélée peu sélective car la formation de nombreux produits secondaires a été observée. Ces composés n'ont pas pu être isolés par chromatographie sur silice c'est pourquoi ils n'ont pas été caractérisés. Toutefois, il est possible qu'ils résultent de méthylations successives de l'amide **57**. En effet, l'acidité des protons en α du groupement carbonyle permet d'envisager la formation de l'éther d'énol **A** et des cétones méthylées **B** et *gem* diméthylées **C** en plus de l'analogue *N*-méthylcyclopropylamine désiré (**Figure 36**).

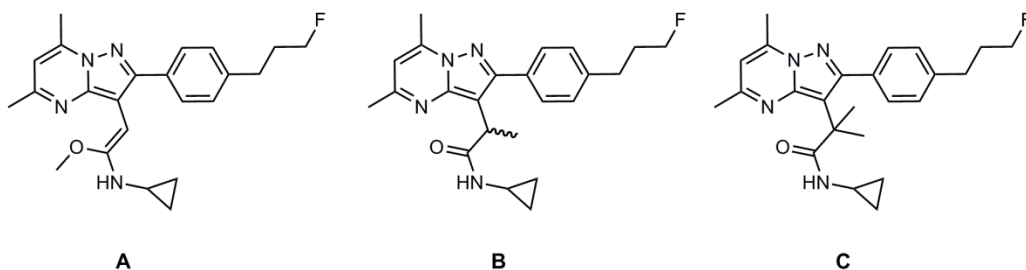
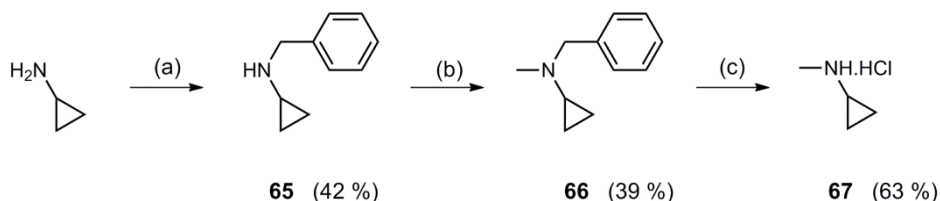


Figure 36. Produits secondaires supposés lors de la méthylation de l'amide **55**.

Etant donné les difficultés à méthyler l'analogue **57** de façon régiosélective, il a été envisagé de préparer la *N*-méthylcyclopropylamine dans un premier temps puis de la coupler à l'ester **54**. La méthylation directe de la *N*-cyclopropylamine n'a pas été envisagée en raison de la volatilité du produit de réaction. Aussi, une stratégie de méthylation indirecte a été préférée. La méthode de préparation de la *N*-méthylcyclopropylamine décrite par Yoshida *et al.*¹³⁸ a permis d'obtenir le synthon **67** en trois étapes avec un rendement global de 10 % comme illustré dans le **Schéma 94**.



Réactifs et conditions: (a) BnBr, Et₃N, THF, t.a., 8 h ; (b) 37 % wt. CH₂O, NaBH₄, 0 °C à t.a., 10 h ; (c) i. H₂, 10 % Pd/C, MeOH, 48 h - ii. HCl.MeOH.

Schéma 94. Schéma de synthèse du chlorhydrate de *N*-méthylcyclopropylamine **67**.

¹³⁸ K.-I. Yoshida, K. Nakayama, Y. Yokomizo, M. Ohtsuka, M. Takemura, K. Hoshino, H. Kanda, K. Namba, H. Nitani, J. Z. Zhang, V. J. Lee, W. J. Watkins. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 8506.

La première réaction a consisté à benzyler la cyclopropylamine par BnBr de façon à la rendre moins volatile et plus commode à manipuler. La benzylamine **65** a été obtenue avec un rendement de 42 % dû en partie à la formation de l'adduit dibenzylé correspondant, lequel représente environ 25 % en masse du brut d'après l'analyse RMN ^1H . Yoshida *et al.* ont quant à eux obtenu un rendement de 48 % pour cette étape.

Ensuite, **65** a été méthylé par amination réductrice du formaldéhyde en présence de NaBH_4 pour donner la *N*-méthyl-*N*-benzylcyclopropylamine **66** avec un rendement moyen de 39 % (49 % pour Yoshida *et al.*). Le clivage du groupement benzyle de **66** a été réalisé à t.a. par hydrogénolyse à l'aide de Pd/C 10 % dans MeOH pendant 48 h. Il a conduit à l'obtention de la *N*-méthylcyclopropylamine qui a finalement été convertie en chlorhydrate par action d'un large excès de HCl (1,25 M dans MeOH) afin de faciliter sa manipulation. Le chlorure de *N*-méthylcyclopropylammonium **67** a ainsi été obtenu avec un rendement de 63 %. Sec, le sel d'ammonium se présente sous la forme de cristaux incolores mais il peut facilement absorber l'eau atmosphérique (hygroscopique) c'est pourquoi il est nécessaire de le conserver sous argon. Le chlorure de *N*-méthylcyclopropylammonium **67** a ensuite été couplé à l'ester **54** avec la méthode utilisant AlMe_3 . Cependant, la pureté de l'analogue amide obtenu n'était pas suffisante pour réaliser les tests *in vitro* et la faible quantité de produit ne permettait pas d'envisager une seconde purification. Il est possible que la formation du complexe méthylcyclopropylaluminium ne soit pas favorable.

2. Synthèse des précurseurs de radiomarquage au fluor-18

La préparation de précurseurs de radiomarquage au fluor-18 n'a pas encore été finalisée, les analogues amides n'ayant pas encore été testés *in vitro* pour leur affinité envers TSPO 18 kDa. Cependant, une voie de synthèse générale a été entreprise pour envisager leur radiomarquage.

2.1. Stratégie de synthèse des précurseurs de radiomarquage amides

La rétrosynthèse des précurseurs, exposée dans le **Schéma 95**, fait intervenir un groupement protecteur (GP) qui sert à protéger la fonction alcool de la chaîne latérale jusqu'à la tosylation finale. La construction du cycle pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine est classique et reprend la séquence utilisée précédemment (cyanylation, C-alkylation, cyclisations I et II). Comme pour la stratégie de synthèse des analogues amides, la C-alkylation permet d'incorporer la fonction ester nécessaire à l'étape d'amination.

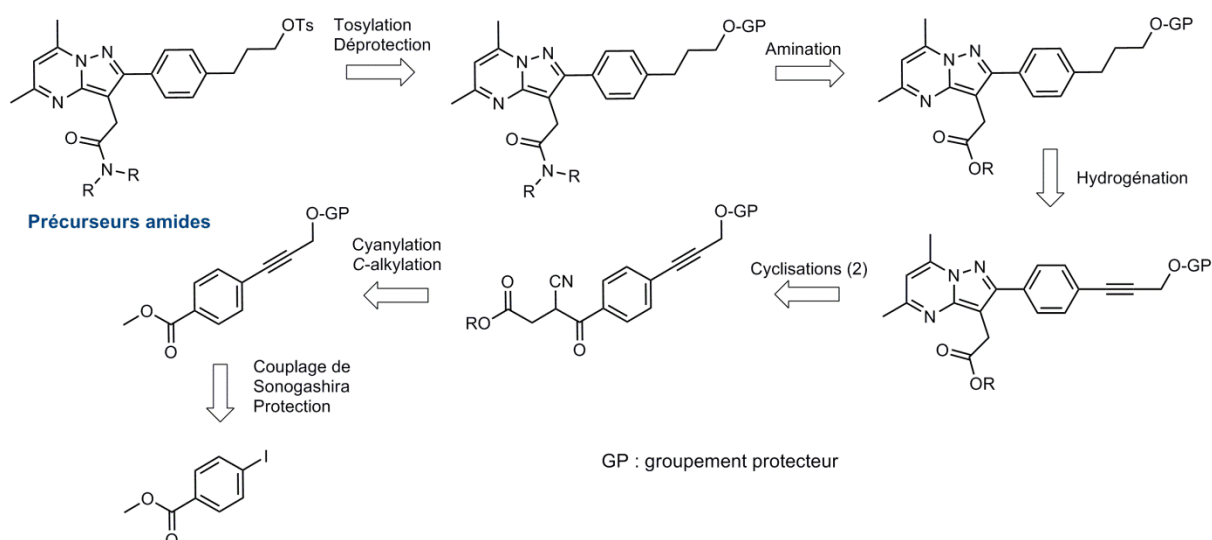


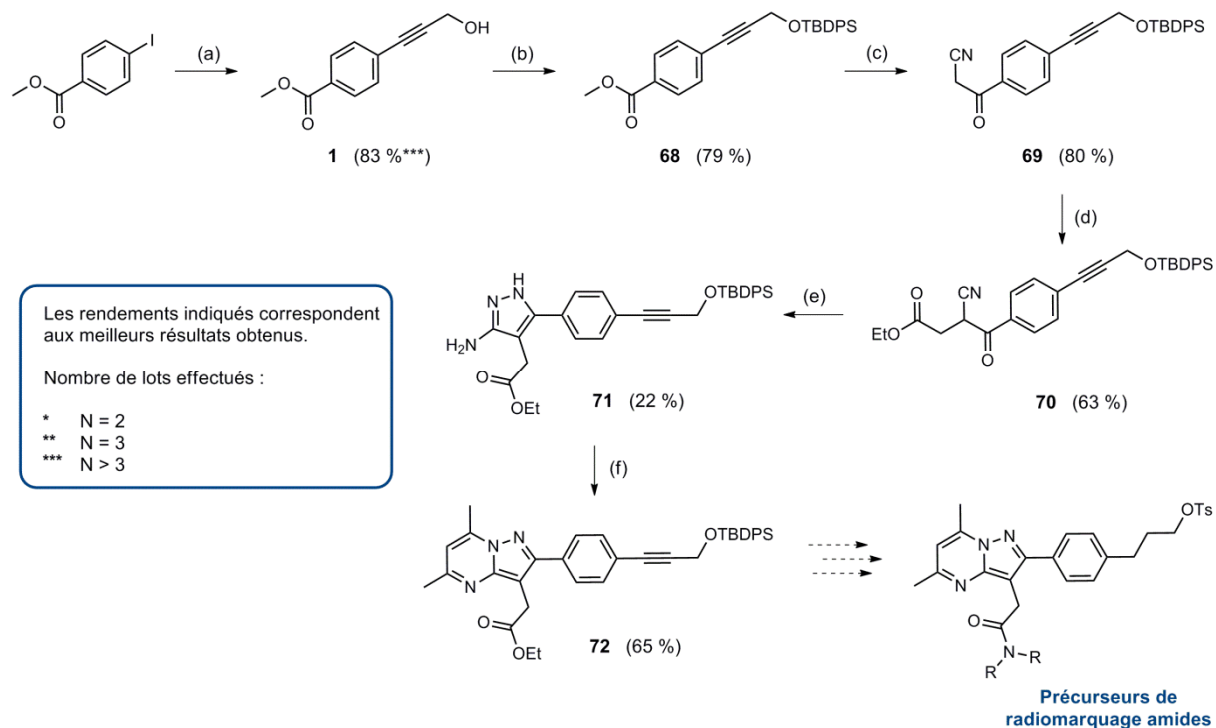
Schéma 95. Rétrosynthèse des précurseurs de marquage amides.

2.2. Résultats de la stratégie de synthèse des précurseurs amides

La séquence réactionnelle, décrite dans le **Schéma 96**, débute par un couplage de Sonogashira qui permet d'obtenir l'alcool **1** avec un bon rendement de 83 % à partir du 4-iodobenzoate de méthyle. Cet alcool est ensuite protégé par action de TBDPSCl dans la pyridine pour générer le silyléther **68** qui est particulièrement robuste. La mise en place du groupement TBDPS a été facile et n'a que peu affecté le rendement global puisque le silyléther **68** a été obtenu avec un rendement de 79 %. Les étapes de cyanylation (c) et de C-alkylation (d) ont également été satisfaisantes en termes de rendement (80 et 63 % respectivement) et ont permis d'obtenir le 1,3-cétonitrile ester **70**. A noter que lors de la C-alkylation, c'est le bromoacétate d'éthyle et non de méthyle qui a été employé afin d'éviter les difficultés de séparation rencontrées dans la stratégie de synthèse des analogues amides. Le composé **70** a ensuite été condensé avec l'hydrazine lors d'une première cyclisation (étape e) mais une quantité importante de ce qui semble être le pyrazole saponifié a été recueillie. Cette hypothèse est basée sur la disparition des deux signaux caractéristiques de l'ester éthylique observés en RMN ^1H . Par ailleurs, le produit secondaire représente pratiquement 60 % en masse de ce qui a été isolé à l'issue de la réaction d'où le mauvais rendement de 22 % en pyrazole **71**. En revanche, la deuxième cyclisation (étape f) a donné d'assez bons résultats puisque la pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine **72** a été obtenue avec un rendement de 65 % et une très bonne pureté après trituration dans le diéther.

Cet intermédiaire commun servira à la préparation d'un ou plusieurs précurseurs de radiomarquage au fluor-18 selon les résultats des évaluations de « binding » *in vitro* des composés fluorés correspondants.

En ce qui concerne les étapes restantes, il est envisagé d'hydrogéner la triple liaison de l'alcyne **72** pour obtenir une chaîne propyle, puis de convertir le groupement ester en amide grâce à la procédure d'amination utilisant AlMe_3 . Ensuite, le groupement TBDPS sera clivé pour régénérer la fonction alcool qui sera finalement tosylé.



Réactifs et conditions: (a) prop-1-yn-3-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, t.a., 48 h ; (b) TBDPSCl, Py, 0 °C à t.a., 12 h ; (c) *n*-BuLi, CH₃CN, THF, -60 °C, 1 h - ii. **65**, -60 °C, 1 h puis - 45 °C, 2 h ; (d) i. NaOH, EtOH, t.a., 10 min - ii. BrCH₂CO₂Et, NaI, t.a., 24 h ; (e) N₂H₄.H₂O, AcOH cat., EtOH, 80 °C, 3 h ; (f) acétylacétone, EtOH, 80 °C, 2 h.

Schéma 96. Schéma réactionnel de synthèse des précurseurs amides.

Troisième partie

Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse avaient pour finalité la synthèse organique, le radiomarquage au fluor-18 et l'évaluation par autoradiographie *in vitro* et imagerie TEP *in vivo* de nouveaux ligands pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acétamides de la protéine TSPO 18 kDa.

En termes de performances souhaitées, ces ligands devaient être plus stables vis-à-vis de la défluoration *in vivo* et présenter une meilleure affinité pour la protéine TSPO 18 kDa que le traceur de référence [^{18}F]DPA-714. A l'issue de ces travaux de thèse, la plupart de ces objectifs ont été atteints.

En chimie organique, la dérivatisation de la chaîne carbonée latérale du DPA-714 (axe de recherche 1) et de la fonction amide de CfO-DPA-714 (axe de recherche 2) ont conduit à la synthèse de dix-neuf ligands en six à dix étapes. Ces ligands sont répartis de la façon suivante: quatre analogues alcanes (**10**, **18a-c**), quatre analogues alcynes (**16a-d**) et un analogue phényle (**38**) dans l'axe de recherche 1 et neuf analogues amides (**53-62**) dans l'axe de recherche 2. Les recherches menées dans l'axe de recherche 1 sur les analogues alcènes n'ont pas permis d'obtenir de composés finaux. Tous les ligands obtenus ont été testés *in vitro* afin de déterminer leur affinité pour la protéine TSPO 18 kDa. Ces tests ont en particulier mis en évidence la sélectivité et la haute affinité des analogues CfO-DPA-714 **10** ($K_i = 0,37 \text{ nM}$) et DPA-C5yne **16c** ($K_i = 0,35 \text{ nM}$) pour la cible biologique visée (**Figure 37**).

Ces composés ont également subi des tests de métabolisation microsomiale afin de s'assurer de leur stabilité *in vivo*, en particulier de l'intégrité de la chaîne latérale portant le fluor-18. Ces tests se sont révélés positifs et ont prouvé que les modifications structurales apportées étaient bénéfiques. Par la suite, les radiotraceurs correspondants [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) et [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) ont été préparés à partir des précurseurs tosylés **39** et **40**. Après optimisation, les radiosynthèses ont permis d'obtenir les radioligands [^{18}F]-**10** et [^{18}F]-**16c** avec des rendements radiochimiques satisfaisants, compris entre 20 et 30 %, et de activités spécifiques de 50 à 90 GBq/ μmol acceptables pour des applications en imagerie du petit animal. Les radiotraceurs [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) et [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) ont finalement été évalués en autoradiographie *in vitro* et en imagerie TEP *in vivo*. Il s'est avéré que leurs performances sont équivalentes voire supérieures à celle du composé de référence, [^{18}F]DPA-714.

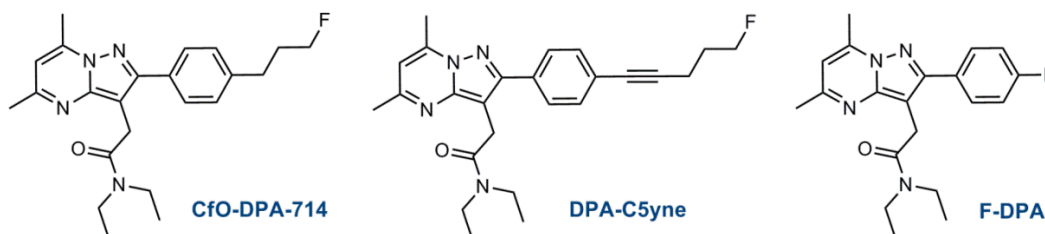


Figure 37. Structures des trois analogues retenus pour le radiomarquage au fluor-18.

Le précurseur ammonium quaternaire **44** sera prochainement utilisé pour l'obtention d'un nouveau radiotraceur, [^{18}F]F-DPA ([^{18}F]-**38**). En série amide, il est prévu de poursuivre les synthèses pour préparer le ou les précurseur(s) de radiomarquage du ou des analogue(s) qui auront démontré les meilleures affinités pour la protéine TSPO 18 kDa et de procéder à leur radiomarquage au fluor-18.

Fourth part

Experimental procedures

Chapter 1: Organic synthesis

1. General information

1.1. Chemicals

Commercially available reagents were purchased from Sigma-Aldrich and used as supplied without further purification unless otherwise stated.

1.2. TLC analysis and flash chromatography

TLCs were run on aluminium pre-coated plates of silica gel 60F₂₅₄ (VWR). The compounds were localized when possible at 254 nm or 365 nm using a UV-lamp and/or by dipping the TLC-plates in a 1 % ethanolic ninhydrin solution, a basic KMnO₄ aqueous solution or a 1 % MeOH/H₂O (50/50, v/v) FeCl₃ solution and developing with a heat gun. Flash chromatographies were carried out on silica gel (0.63-0.200 mm, VWR) columns.

1.3. HPLC systems and conditions

[HPLC A]: Waters system equipped with a 600E System Controller, a Prep LC 3000 pump, a 490E programmable multiwavelength UV-detector and a Kipp and Zonen BD12E flatbed recorder ; column: preparative Zorbax[®] RX-SIL, Hewlett Packard (250 x 21.2 mm) ; porosity 5 µm ; conditions: CH₂Cl₂ / MeOH: 98.5 / 1.5 (v/v) ; 10 mL/min at r.t. ; UV detection at 230 nm.

[HPLC B]: Waters system equipped with a 510 pump and a Shimadzu SPD-10A UV-multiwavelength detector. Column: semipreparative SymmetryPrep[®] C-18, Waters (300 x 7.8 mm) ; porosity 7 µm ; conditions: CH₃CN / H₂O / TFA: 50 / 50 / 0.1 (v/v/v) ; 5 mL/min at r.t. ; UV detection at 254 nm.

[HPLC C]: Waters system equipped with a 510 pump and a Shimadzu SPD-10A UV-multiwavelength detector. Column: semipreparative SymmetryPrep[®] C-18, Waters (300 x 7.8 mm) ; porosity 7 µm ; conditions: CH₃CN / H₂O / TFA: 60 / 40 / 0.1 (v/v/v) ; 5 mL/min at r.t. ; UV detection at 254 nm.

[HPLC D]: Waters system equipped with a 515 pump and a Shimadzu SPD-10A UV-multiwavelength detector. Column: semipreparative X-Terra[®] RP18, Waters (300 x 7.8 mm) ; porosity 7 µm ; conditions: CH₃CN / aq. 0.1 M NH₄OAc (pH 10) : 40 / 60 (v/v) ; 6 mL/min at r.t. ; UV detection at 254 nm.

[HPLC E]: Waters Alliance 2690 (or a Waters binary HPLC Pump 1525) equipped with a UV spectrophotometer (Photodiode Array Detector, Waters 996) and a Berthold LB509 radioactivity detector ; column: analytical Symmetry-M[®] C-18, Waters (50 x 4.6 mm) ; porosity 3.5 µm ; conditions: solvA/solvB: 20/80 (v/v) [solvA: H₂O containing Low-UV PIC[®] B7

reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL ; solvB: H₂O/CH₃CN: 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL] ; 2.0 mL/min at r.t. ; UV detection at 280 nm.

[HPLC F]: Waters Alliance 2965 system equipped with a Waters 2996 Photodiode Array Detector and a Berthold LB509 radioactivity detector ; column: analytical Symmetry[®] C-18, Waters (50 x 4.6 mm) ; porosity 3.5 μ m ; conditions: [solvA: H₂O containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL ; solvB: H₂O/CH₃CN: 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL] ; 2 mL/min at r.t. ; UV detection at 259 nm.

[HPLC G]: TRACERLab FX N Pro (GE Medical Systems, Germany) integrated system, equipped with a Sykam S1122 Solvent Delivery System (pump), a Knauer K-2501 UV-multiwavelength detector and a miniaturized gamma-radioactivity detector. Column: semipreparative SymmetryPrep[®] C-18, Waters (300 x 7.8 mm) ; porosity 7 μ m ; conditions: CH₃CN / H₂O / TFA: 60 / 40 / 0.1 (v/v/v) ; 5 mL/min at r.t. ; UV detection at 254 nm.

[HPLC H]: TRACERLab FX FN (GE Medical Systems, Germany) integrated system, equipped with a Sykam S1122 Solvent Delivery System (pump), a Knauer K-2501 UV-multiwavelength detector and a miniaturized gamma-radioactivity detector and a miniaturize gamma-radioactivity detector. Column: X-Terra[®] RP18, Waters (300 x 7.8 mm) ; porosity 7 μ m ; conditions: CH₃CN / aq. 0.1 M NH₄OAc (pH 10) : 40 / 60 (v/v) ; 4 mL/min at r.t. ; UV detection at 254 nm.

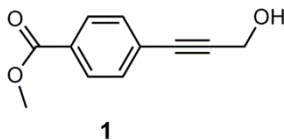
1.4. Spectroscopic analyses

Proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and carbon-13 nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) spectra were recorded on a Bruker (Wissembourg, France) Avance (400 MHz) apparatus. All NMR spectra were recorded at 23 °C. Proton and carbon chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane and are referenced to the proton resonance of the hydrogenated residue of the deuterated solvents CDCl₃ (CHCl₃, δ = 7.26 ppm), CD₂Cl₂ (CDHCl₂, δ = 5.32 ppm), CD₃CN (CHD₂CN, δ = 1.96 ppm), MeOD-*d*₄ (CHD₂OH, δ = 3.31 ppm) or DMSO-*d*₆ (DMSO-*d*₅, δ = 2.50 ppm) for ¹H-NMR and the carbon resonance of CDCl₃ (δ = 77.2 ppm), CD₂Cl₂ (δ = 54.0 ppm), CD₃CN (δ = 118.3 ppm), MeOD-*d*₄ (δ = 49.0 ppm) or DMSO-*d*₆ (δ = 49.0 ppm) for ¹³C-NMR. For ¹H-NMR, data are presented as follows: chemical shift, multiplicity (s: singlet ; d: doublet ; t: triplet ; q: quadruplet ; dt: doublet of triplet ; m: multiplet ; bs: broad signal), coupling constants (J in Hertz) and integration. For ¹³C-NMR, data are presented as follows: chemical shift, multiplicity (s: singlet ; d: doublet ; q: quadruplet), coupling constants (J in Hertz) and integration.

The mass spectra (MS) were measured on a Thermo Electron (Les Ulis, France) Ion Trap LCQ Deca XP+ spectrometer (ESI+). The high resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed by Imagif (ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette) by electrospray with positive (ESI+) or negative (ESI-) ionization mode.

2. Experimental procedures

Methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yle)benzoate (**1**)

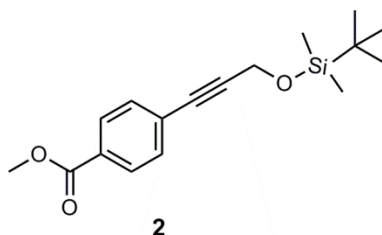


To a solution of methyl 4-iodobenzoate (25 g, 95.4 mmol) in triethylamine (500 mL) was added prop-2-yn-1-ol (6.7 mL, 115 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was degassed under vacuum and filled with argon (2 cycles). Then, palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (670 mg, 0.956 mmol, 1 mol%) and copper iodide (182 mg, 0.953 mmol, 0.01 eq) were added to the suspension and the reaction mixture was stirred at r.t. for a week. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (400 mL). The organic layer was washed with 1 M aqueous hydrochloric acid (100 mL), water (2 x 200 mL) and brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate: 60/40 v/v) to afford pure methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yle)benzoate (**1**, 15.6 g, 82.0 mmol) as a yellow crystalline powder (86 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 60/40 v/v): 0.24.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.98 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.48 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 4.52 (d, 2H, $J = 4.4$ Hz, CH_2OH), 3.90 (s, 3H, CH_3), 1.93 (bt, 1H, $w_{1/2} = 13$ Hz, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 166.5 [C], 131.5 [2xCH], 129.7 [C], 129.4 [2xCH], 127.2 [C], 90.1 [C], 84.8 [C], 52.2 [CH_3], 51.5 [CH_2].

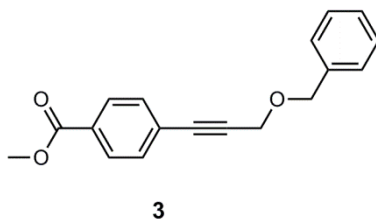
Methyl 4-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)benzoate (2)

To a solution of methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (**1**, 191 mg, 1.00 mmol) under argon in anhydrous pyridine (4 mL) and cooled at 0 °C with an ice bath was added dropwise a solution of *tert*-butyldimethylsilyl chloride (226 mg, 1.50 mmol, 1.5 eq) in anhydrous pyridine (2 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h 30. Then, the reaction was quenched with methanol (2 mL) and the mixture was concentrated to dryness (40 °C, 30 mbar). The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and the insoluble inorganic salt was filtered off on a Büchner funnel. The filtrate was washed with 0.1 M aqueous hydrochloric acid (10 mL), water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar) to afford methyl 4-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)benzoate (**2**, 231 mg, 0.76 mmol) as a dark orange oil which spontaneously crystallized (76 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 2/1 v/v): 0.71.

¹H-NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz): δ 7.98 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.51 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 4.56 (s, 2H, CH₂), 3.90 (s, 3H, CH₃), 0.95 (s, 9H, 3xCH₃, *t*-Bu), 0.18 (s, 6H, 2xCH₃, Si(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz): δ 166.2 [C], 131.4 [2xCH], 129.7 [C], 129.3 [2xCH], 127.4 [C], 91.0 [C], 83.6 [C], 52.0 [CH₃], 52.0 [CH₂], 25.5 [3xCH₃], 18.1 [C], -5.5 [2xCH₃].

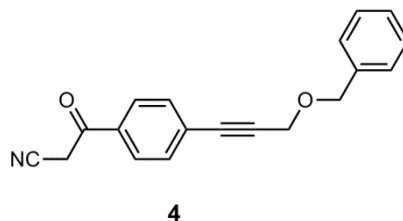
Methyl 4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)benzoate (3)

To a solution of methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (**1**, 11.5 g, 60.5 mmol) under argon in anhydrous tetrahydrofuran (200 mL) was added sodium iodide (1.81 g, 12.1 mmol, 0.2 eq). The reaction mixture was cooled to 0 °C with an ice bath and sodium hydride (1.74 g, 72.5 mmol, 1.2 eq) was carefully added portionwise. Once the gaseous emission finished (15 min), benzyl bromide (7.9 mL, 66.5 mmol, 1.1 eq) was added dropwise over 10 min. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 15 min and then at r.t. for 8 h. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with methanol (10 mL) and the mixture was concentrated to dryness (30 °C, 400 mbar). The residue was diluted in dichloromethane (400 mL), and the resulting solution was washed with water (2 x 200 mL) and brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate: 80/20 to 70/30 v/v) to afford methyl 4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)benzoate (**3**, 11.3 g, 40.3 mmol) as a pale yellow oil (67 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 70/30 v/v): 0.46.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.99 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.51 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.41-7.32 (m, 5H, Bn), 4.68 (s, 2H, CH₂), 4.42 (s, 2H, CH₂), 3.92 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz): δ 166.3 [C], 137.6 [C], 131.6 [2xCH], 129.8 [C], 129.3 [2xCH], 128.3 [2xCH], 128.0 [2xCH], 127.8 [CH], 127.2 [C], 88.3 [C], 85.4 [C], 71.7 [CH₂], 57.8 [CH₂], 52.1 [CH₃].

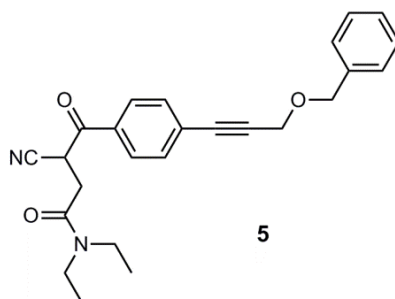
3-(4-(3-(Benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (4)

To an airtight flask under argon containing anhydrous tetrahydrofuran (100 mL) cooled at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liquid nitrogen/acetone bath) was carefully channelled a 1.6 M *n*-butyllithium solution in hexanes (50 mL, 80.0 mmol, 2.1 eq). A solution of acetonitrile (4.2 mL, 130 mmol, 3.5 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was cautiously added dropwise while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 20 min at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, a solution of methyl 4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)benzoate (**3**, 10.5 g, 37.4 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was carefully channelled to the mixture over 15 min while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. After the addition, the content was stirred for 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then for 2 h at $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with methanol (10 mL) at $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, the reaction mixture was acidified with 37 % aqueous hydrochloric acid to pH 3 and extracted with ethyl acetate (2 x 200 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 mbar) to afford pure 3-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**4**, 9.45 g, 32.7 mmol) as a beige solid (87 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 40/60 v/v): 0.76.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.86 (d, 2H, $J = 8.0\text{ Hz}$, Ph), 7.57 (d, 2H, $J = 8.0\text{ Hz}$, Ph), 7.40-7.32 (m, 5H, Bn), 4.67 (s, 2H, CH_2), 4.42 (s, 2H, CH_2), 4.07 (s, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 186.3 [C], 137.1 [C], 133.4 [C], 132.2 [2xCH], 129.2 [C], 128.5 [2xCH], 128.3 [2xCH], 128.1 [2xCH], 128.0 [CH], 113.6 [C], 90.0 [C], 85.1 [C], 72.0 [CH_2], 57.8 [CH_2], 29.4 [CH_2].

4-(4-(3-(Benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-cyano-*N,N*-diethyl-4-oxobutanamide (5)

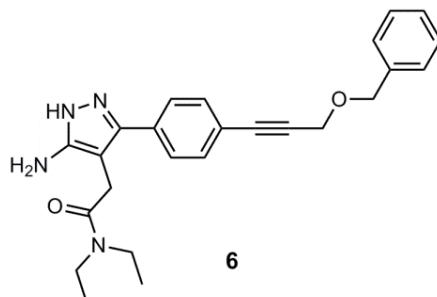
To a solution of 3-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**4**, 9.48 g, 32.8 mmol) in a mixture of ethanol (150 mL) and water (10 mL) was added in one portion under vigorous stirring sodium hydroxide (1.44 g, 36.0 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 15 min. Then, sodium iodide (9.80 g, 65.3 mmol, 2 eq) and *N,N*-diethylchloroacetamide (3.0 mL, 21.9 mmol, 0.7 eq) were added to the mixture which was stirred overnight at r.t. The day after, additional amount of *N,N*-diethylchloroacetamide (1 mL, 7.31 mmol, 0.2 eq) was added and after 4 days, the reaction mixture was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar). The residue was diluted in a saturated aqueous ammonium chloride solution (200 mL) and few drops of 37 % aqueous hydrochloric acid were added to fix the pH at 2. The mixture was then extracted with ethyl acetate (2 x 300 mL) and the combined organic layers were washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate: 70/30 v/v) to afford 4-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-cyano-*N,N*-diethyl-4-oxobutanamide (**5**, 7.83 g, 19.4 mmol) as a yellow oil (59 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 40/60 v/v): 0.48.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.01 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.58 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.41-7.32 (m, 5H, Bn), 5.00 (dd, 1H, $J = 9.6$ & 4.4 Hz, CH), 4.68 (s, 2H, CH_2), 4.43 (s, 2H, CH_2), 3.45-3.29 (m, 5H, $\text{CHH}' + 2\times\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 2.89 (dd, 1H, $J = 16.4$ & 4.4 Hz, CHH'), 1.27 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.09 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 188.8 [C], 166.9 [C], 137.2 [C], 133.5 [C], 132.1 [2xCH], 128.9 [C], 128.8 [2xCH], 128.4 [2xCH], 128.1 [2xCH], 127.9 [CH], 116.9 [C], 89.5 [C], 85.3 [C], 71.9 [CH_2], 57.8 [CH_2], 42.0 [CH_2], 40.6 [CH_2], 33.8 [CH], 32.7 [CH_2], 14.0 [CH_3], 12.9 [CH_3].

2-(5-Amino-3-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethyl acetamide (6)

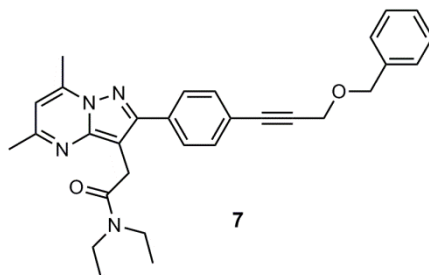


To a solution of 4-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-cyano-*N,N*-diethyl-4-oxobutanamide (**5**, 2.63 g, 6.53 mmol) in ethanol (30 mL) were added dropwise at r.t. monohydrated hydrazine (640 μ L, 13.1 mmol, 2 eq) and glacial acetic acid (654 μ L, 11.4 mmol, 1.7 eq). The reaction mixture was heated to reflux for 5 h. Then, it was concentrated to dryness (40 $^{\circ}$ C, 80 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (50 mL) and a 1 M sodium hydroxide aqueous solution (10 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 x 20 mL) and brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 97/3 to 94/6 v/v) to afford 2-(5-amino-3-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**6**, 1.15 g, 2.76 mmol) as a golden foam (42 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 92/8 v/v): 0.25.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.46 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.40-7.29 (m, 7H, Ph/Bn), 6.02 (b, 3H, $w_{1/2} = 103$ Hz, $\text{NH}_2 + \text{NH}$), 4.67 (s, 2H, CH_2), 4.40 (s, 2H, CH_2), 3.49 (s, 2H, CH_2), 3.31 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.04 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.06 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 0.92 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.1 [C], 153.5 [C], 142.8 [C], 137.3 [C], 132.1 [2xCH], 131.0 [C], 128.4 [2xCH], 128.0 [2xCH], 127.9 [CH], 127.6 [2xCH], 122.6 [C], 97.5 [C], 86.3 [C], 85.9 [C], 71.7 [CH_2], 57.8 [CH_2], 42.3 [CH_2], 40.5 [CH_2], 28.4 [CH_2], 14.0 [CH_3], 12.9 [CH_3].

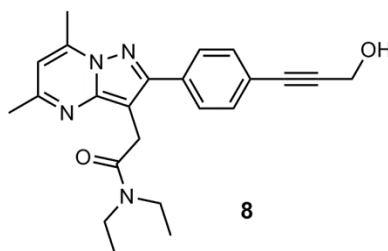
2-(2-(4-(3-(Benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (7)

To a solution of 2-(5-amino-3-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**6**, 1.00 g, 2.40 mmol) in ethanol (20 mL) was added acetylacetone (246 μ L, 2.40 mmol, 1 eq). The reaction mixture was refluxed for 10 h and left overnight at r.t. without stirring to promote crystallisation. The day after, the crystals were filtered on a Büchner funnel, washed with iced ethanol (3 mL) and suck-dried with vacuum to afford 2-(2-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**7**, 839 mg, 1.75 mmol) as a shiny beige powder (73 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.38.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.82 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.54 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.42-7.31 (m, 5H, Bn), 6.54 (s, 1H), 4.70 (s, 2H, CH_2), 4.43 (s, 2H, CH_2), 3.96 (s, 2H, CH_2), 3.52 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3), 3.41 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.23 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3), 1.12 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.8 [C], 157.6 [C], 154.3 [C], 147.5 [C], 144.9 [C], 137.4 [C], 133.9 [C], 131.8 [2xCH], 128.5 [2xCH], 128.4 [2xCH], 128.1 [2xCH], 127.8 [CH], 122.4 [C], 108.5 [CH], 101.4 [C], 86.5 [C], 85.7 [C], 71.7 [CH_2], 57.9 [CH_2], 42.3 [CH_2], 40.6 [CH_2], 28.0 [CH_2], 24.5 [CH_3], 16.8 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyprop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (8)**

Method 1. To a solution of 2-(2-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**7**, 500 mg, 1.04 mmol) in dichloromethane (15 mL) was carefully added under argon at -30 °C a 1 M boron trichloride solution in dichloromethane (3.12 mL, 3.12 mmol, 3 eq) over 10 min. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched at -20 °C with methanol (0.5 mL). The resulting mixture was basified with a saturated potassium carbonate aqueous solution to pH 10. The organic layer was collected whereas the aqueous layer was extracted twice with dichloromethane (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 97/3 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyprop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**8**, 341 mg, 0.873 mmol) as off-white crystals (84 % yield).

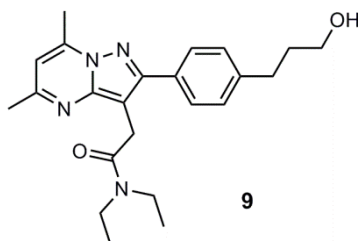
Method 2. To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**14**, 1.50 g, 3.24 mmol) in triethylamine were added (under argon) prop-2-yn-1-ol (215 μ L, 3.69 mmol, 1.1 eq), palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (23 mg, 1 mol %) and copper iodide (6 mg, 0.032 mmol, 0.01 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 72 h. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (50 mL). The organic layer was collected whereas the aqueous layer was extracted once again with ethyl acetate (20 mL). The organic layers were then combined, washed with water (2 x 20 mL) and brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyprop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**8**, 813 mg, 2.08 mmol) as a beige powder (64 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.29.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.79 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.50 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.55 (s, 1H), 4.48 (s, 2H, CH_2OH), 3.98 (s, 2H, CH_2), 3.52 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.76 (s, 3H, CH_3), 2.59 (s, 3H, CH_3), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.9 [C], 157.7 [C], 154.2 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 133.8 [C], 131.7 [2xCH], 128.4 [2xCH], 122.4 [C], 108.5 [CH], 101.3 [C], 88.1 [C], 85.4 [C], 51.4 [CH_2], 42.3 [CH_2], 40.6 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.5 [CH_3], 16.8 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 391.2137 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 391.2134).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (9)**

Method 1. To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**8**, 813 mg, 2.08 mmol) in dichloromethane (25 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal (50 mg, 2 mol %). The reaction flask was degassed under vacuum, filled with hydrogen at 1 atm and the reaction mixture was stirred at r.t. over the week-end. The reaction mixture was then filtered on a silica pad and washed with dichloromethane/methanol 80/20 v/v (200 mL). The filtrate was concentrated to dryness (30 °C, 300 mbar) to afford *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**9**, 753 mg, 1.91 mmol) as a colorless oil (92 % yield).

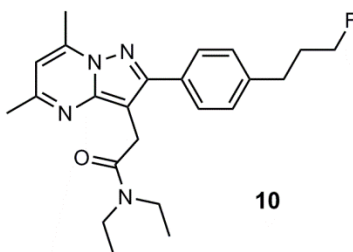
Method 2. To a solution of 2-(2-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**7**, 500 mg, 1.04 mmol) in methanol/dichloromethane 2:1 (15 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal (22 mg, 2 mol %). The flask was degassed under vacuum and filled with hydrogen at 1 atm (2 cycles). A 250 mL hydrogen balloon was fixed to the flask with a needle through the septum and the reaction mixture was stirred at r.t. for 24 h. The reaction mixture was then filtered on a silica pad and washed with dichloromethane/methanol 80:20 v/v (200 mL). The filtrate was concentrated to dryness (30 °C, 300 mbar) and the residue was purified by silica gel flash chromatography (dichloromethane/methanol: 99/1 to 98.5/1.5 v/v) to afford *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**9**, 309 mg, 0.783 mmol) as a pink oil (75 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 96/4 v/v): 0.37.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.70 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.26 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.50 (s, 1H), 3.91 (s, 2H, CH₂), 3.63 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 3.48 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.40 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.73 (s, 3H, CH₃), 2.71 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 1.87 (q⁵, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz): δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 142.3 [C], 131.4 [C], 128.5 [2xCH], 128.3 [2xCH], 108.2 [CH], 100.9 [C], 61.9 [CH₂], 42.1 [CH₂], 40.4 [CH₂], 34.3 [CH₂], 31.7 [CH₂], 27.9 [CH₂], 24.3 [CH₃], 16.6 [CH₃], 14.0 [CH₃], 12.8 [CH₃].

HRMS (ESI⁺) *m/z* 395.2447 [M+H]⁺ (calculated: 395.2447).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (10)**

To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**9**, 168 mg, 0.426 mmol) in dichloromethane (2 mL) was slowly added dropwise a 50 % v/v Deoxofluor[®] solution in toluene (0.40 mL, 0.940 mmol, 2.2 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred for 24 h at r.t. Then, it was diluted with water (10 mL). The organic layer was isolated whereas the aqueous layer was extracted with dichloromethane (5 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 5 mL), brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 98/2 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**10**, 66 mg, 0.166 mmol) as a white solid (39 % yield). Note that for the radiochemistry part, HPLC conditions were developed (HPLC D, F and H).

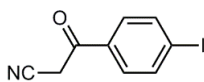
R_f (dichloromethane/methanol: 96/4 v/v): 0.67.

t_R : 7.8 min [HPLC D] ; t_R : 2.9 min [HPLC F] ; t_R : 11.0 min [HPLC H].

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.74 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.28 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H, J^2_{HF} = 46.8 Hz, J^3_{HH} = 6.0 Hz, CH₂), 3.93 (s, 2H, CH₂), 3.49 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.40 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.78 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH₂), 2.74 (s, 3H, CH₃), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.02 (dt, J^3_{HF} = 25.6 Hz, J^3_{HH} = 7.6 & 6.0 Hz, CH₂), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CD₂Cl₂, 100 MHz): δ 169.6 [C], 157.7 [C], 154.1 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 141.4 [C], 131.7 [C], 128.5 [2xCH], 128.4 [2xCH], 108.2 [CH], 101.0 [C], 83.2 [d, J^1_{CF} = 164 Hz, CH₂], 42.1 [CH₂], 40.4 [CH₂], 31.9 [d, J^2_{CF} = 20 Hz, CH₂], 31.0 [d, J^3_{CF} = 6 Hz, CH₂], 27.9 [CH₂], 24.3 [CH₃], 16.5 [CH₃], 14.0 [CH₃], 12.8 [CH₃].

HRMS (ESI+) m/z 397.2411 [M+H]⁺ (calculated: 397.2404).

3-(4-Iodophenyl)-3-oxopropanenitrile (11)**11**

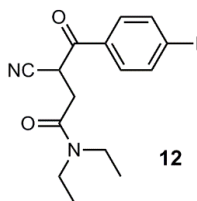
To an airtight flask under argon containing anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) cooled at -60 °C (liquid nitrogen/acetone bath) was carefully channelled a 1.6 M *n*-butyllithium solution in hexanes (62 mL, 99.2 mmol, 2.2 eq). A solution of acetonitrile (5.2 mL, 100 mmol, 2.2 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was cautiously added to the reaction mixture over 15-20 min while maintaining the temperature below -50 °C. The content was then stirred for 30 min at -60 °C. Methyl 4-iodobenzoate (12.0 g, 45.8 mmol) dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (70 mL) was cautiously channelled to the mixture over 20 min while maintaining the temperature below -50 °C. Once the addition finished, the reaction mixture was stirred for 1 h at -60 °C, then 2 h at -45 °C. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched at -40 °C with water (200 mL) under vigorous stirring. Then, a 37 % aqueous hydrochloric acid solution was added to acidify the aqueous layer at pH 2. A white precipitate was filtered off with a Büchner funnel (inorganic salt). The filtrate was extracted with ethyl acetate (2 x 200 mL) and the combined organic layers were washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (35 °C, 150 mbar) to afford pure 3-(4-iodophenyl)-3-oxopropanenitrile (**11**, 8.64 g, 31.9 mmol) as a shiny beige solid (70 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v): 0.37.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3CN , 400 MHz): δ 7.95 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 7.64 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 4.29 (s, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3CN , 100 MHz): δ 188.5 [C], 138.2 [2xCH], 134.1 [C], 129.7 [2xCH], 114.6 [C], 101.8 [C], 29.7 [CH_2].

HRMS (ESI-) m/z 269.9421 [M-H] $^-$ (calculated: 269.9416).

3-Cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-iodophenyl)-4-oxobutanamide (12)

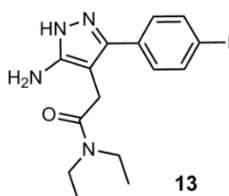
To a solution of 3-(4-iodophenyl)-3-oxopropanenitrile (**11**, 8.64 g, 31.9 mmol) in a mixture of ethanol (170 mL) and water (30 mL) was added portionwise and under vigorous stirring sodium hydroxide (1.40 g, 35.0 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred for 15 min at r.t. and then sodium iodide (9.60 g, 64.0 mmol, 2.0 eq) was added in one portion, followed by *N,N*-diethylchloroacetamide (4.40 mL, 32.1 mmol) which was slowly added dropwise. The reaction mixture was stirred for 4 days at r.t. Once the reaction completed (TLC-monitoring), the suspension was filtered on a Büchner funnel to remove inorganic salt and the filtrate was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar). The residue was directly purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 98/2 v/v) to afford pure 3-cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-iodophenyl)-4-oxobutanamide (**12**, 6.61 g, 17.2 mmol) as a beige powder (54 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v): 0.57.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.60 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 4.95 (dd, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, CH), 3.50-3.25 (m, 5H, $\text{CHH}' + 2\text{xNCH}_2\text{CH}_3$), 2.88 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz, CHH'), 1.27 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, NCH_2CH_3), 1.10 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 189.1 [C], 166.8 [C], 138.4 [2xCH], 133.6 [C], 130.1 [2xCH], 116.7 [C], 102.8 [C], 42.0 [CH_2], 40.6 [CH_2], 33.7 [CH], 32.7 [CH_2], 14.0 [CH_3], 12.9 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 385.0428 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 385.0413).

2-(5-Amino-3-(4-iodophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N,N-diethylacetamide (13)

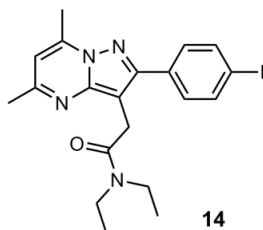
To a solution of 3-cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-iodophenyl)-4-oxobutanamide (**12**, 2.25 g, 5.86 mmol) in ethanol (30 mL) was added monohydrated hydrazine (802 μ L, 16.4 mmol, 2.8 eq) and glacial acetic acid (586 μ L, 10.2 mmol, 1.7 eq). The reaction mixture was heated at 80 °C for 3 h and then, it was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar). The residue was partitioned between water (20 mL), which was basified at pH 10 with a 3 M sodium hydroxide aqueous solution, and ethyl acetate (100 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 x 20 mL) and brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was triturated in cold diethyl ether (10 mL) to give a solid which was collected on a Büchner funnel, washed with cold diethyl ether (2 x 5 mL) and suck-dried to afford the pure 2-(5-amino-3-(4-iodophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**13**, 1.80 g, 4.52 mmol) as a beige powder (77 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.19.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.78 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 7.22 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 3.54 (s, 2H, CH_2), 3.31 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.24 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.06 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.00 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): δ 170.9 [C], 152.5 [C], 143.0 [C], 137.6 [2xCH], 131.0 [C], 129.2 [2xCH], 97.0 [C], 93.0 [C], 42.1 [CH_2], 40.4 [CH_2], 27.8 [CH_2], 12.7 [CH_3], 11.7 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 399.0674 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 399.0682).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl) acetamide (**14**)**

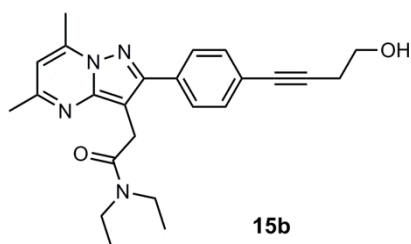
To a solution of 2-(5-amino-3-(4-iodophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**13**, 7.00 g, 17.6 mmol) in ethanol (140 mL) was added acetylacetone (2.9 mL, 28.2 mmol, 1.6 eq). The reaction mixture was heated to reflux for 5 h. Then, it was left without stirring overnight at r.t. allowing often the product to crystallize spontaneously (if not, the crystallization was initiated by scrubbing a glass rod on the flask wall). The crystals were filtered on a Büchner funnel, washed with cold ethanol (2 x 20 mL) and suck-dried under vacuum to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl) acetamide (**14**, 6.40 g, 13.8 mmol) as shiny white needles (78 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.53.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.77 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 7.60 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 3.95 (s, 2H, CH_2), 3.52 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.8 [C], 157.7 [C], 154.0 [C], 147.6 [C], 144.7 [C], 137.5 [2xCH], 133.3 [C], 130.4 [2xCH], 108.5 [CH], 101.2 [C], 94.4 [C], 42.3 [CH_2], 40.6 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.8 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 463.1011 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 463.0995).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (15b)**

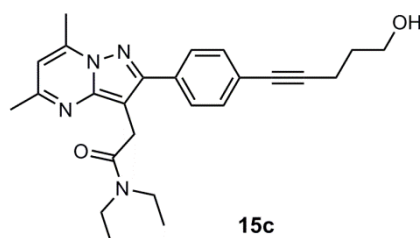
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**14**, 200 mg, 0.432 mmol) in triethylamine were added (under argon) but-3-yn-1-ol (39 μ L, 0.515 mmol, 1.2 eq), palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (2 mg, 0.5 mol %) and copper iodide (1 mg, 5.25 μ mol, 0.01 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 48 h. Then, it was concentrated to dryness (40 $^{\circ}$ C, 50 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (20 mL) and water (20 mL). The organic layer was collected and the aqueous layer was extracted once with ethyl acetate (20 mL). The organic layers were then combined, washed with water (2 x 5 mL) and brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97/3 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15b**, 136 mg, 0.336 mmol) as a beige crystalline powder (78 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.22.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.77 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.48 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.53 (s, 1H), 3.91 (s, 2H, CH_2), 3.80 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH_2OH), 3.50 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 2.73 (s, 3H, CH_3), 2.69 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH_2), 2.54 (s, 3H, CH_3), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 1.10 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.9 [C], 157.7 [C], 154.3 [C], 147.7 [C], 144.7 [C], 133.3 [C], 131.7 [2xCH], 128.4 [2xCH], 123.2 [C], 108.5 [CH], 101.2 [C], 87.2 [C], 82.3 [C], 61.0 [CH_2], 42.3 [CH_2], 40.6 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.6 [CH_3], 23.8 [CH_2], 16.8 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 405.2303 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 405.2291).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (15c)**

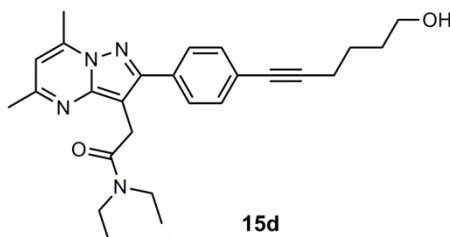
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**14**, 281 mg, 0.608 mmol) in triethylamine (4 mL) were added (under argon) pent-4-yn-1-ol (68 μ L, 0.731 mmol, 1.2 eq), palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (2 mg, 0.5 mol %) and copper iodide (1 mg, 5.25 μ mol, 0.01 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 72 h. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (20 mL) and water (20 mL). The organic layer was collected whereas the aqueous layer was extracted once with ethyl acetate (20 mL). The organic layers were then combined, washed with water (2 x 5 mL) and brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 98.5/1.5 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15c**, 175 mg, 0.418 mmol) as a white solid (69 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 94/6 v/v): 0.39.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.74 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.46 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 3.93 (s, 2H, CH_2), 3.81 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH_2OH), 3.49 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 2.55 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH_2), 1.86 (q⁵, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH_2), 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.8 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 133.0 [C], 131.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 123.6 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 90.2 [C], 81.1 [C], 61.7 [CH_2], 42.2 [CH_2], 40.6 [CH_2], 31.3 [CH_2], 28.0 [CH_2], 24.5 [CH_3], 16.8 [CH_3], 16.0 [CH_2], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 419.2460 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (calculated: 419.2447).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyhex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15d**)**

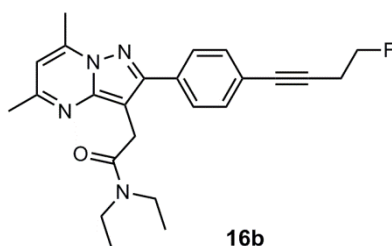
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**14**, 200 mg, 0.433 mmol) in triethylamine (4 mL) were added (under argon) hex-5-yn-1-ol (65 μ L, 0.589 mmol, 1.4 eq), palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (2 mg, 0.5 mol %) and copper iodide (1 mg, 5.25 μ mol, 0.01 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 24 h. Then, it was concentrated to dryness (40 $^{\circ}$ C, 50 mbar) and ethyl acetate (10 mL) was added to the residue (precipitation). The solid was filtered on a Büchner funnel, washed with cold diethyl ether (2 x 3 mL) and suck-dried under vacuum to afford *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxyhex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15d**, 112 mg, 0.259 mmol). The mother liquors were concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 150 mbar) and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (ethyl acetate). Unreacted starting material (20 mg, 0.0432 mmol) was recovered and additional amount of the desired product (19 mg, 0.044 mmol) was isolated (**15d**, 131 mg overall, 0.303 mmol) as a shiny beige crystalline solid (80 % corrected yield).

R_f (dichloromethane/methanol 95/5 v/v): 0.23.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.75 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.46 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 3.94 (s, 2H, CH_2), 3.69 (t, 2H, $J = 4.0$ Hz, CH_2OH), 3.49 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.46 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2), 1.81-1.65 (m, 4H, 2x CH_2), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 132.8 [C], 131.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 123.8 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 90.7 [C], 80.9 [C], 62.3 [CH_2], 42.2 [CH_2], 40.6 [CH_2], 31.8 [CH_2], 28.0 [CH_2], 24.9 [CH_2], 24.3 [CH_3], 19.2 [CH_2], 16.9 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 433.2612 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 433.2604).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-fluorobut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (16b)**

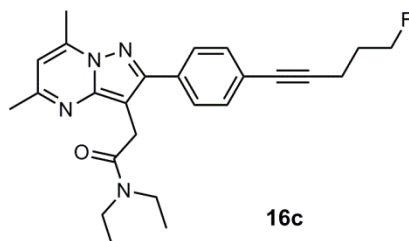
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl) acetamide (**15b**, 260 mg, 0.643 mmol) in dichloromethane (5 mL) was slowly added dropwise 50 % v/v Deoxofluor® in toluene (0.60 mL, 1.41 mmol, 2.2 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred for 4 days at r.t. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (20 mL). The organic layer was washed with water (2 x 5 mL) and brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 99/1 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-fluorobut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl) acetamide (**16b**, 162 mg, 0.399 mmol) as a colorless oil (62 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.48.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.77 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.48 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 4.60 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 46.8$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, CH_2F), 3.94 (s, 2H, CH_2), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.86 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 19.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, CH_2), 2.73 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 1.24 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.0 [C], 147.5 [C], 145.1 [C], 133.2 [C], 131.7 [2xCH], 128.5 [2xCH], 123.1 [C], 108.3 [CH], 101.3 [C], 89.4 [C], 85.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 6$ Hz, C], 81.3 [d, $J^1_{\text{CF}} = 171$ Hz, CH_2], 42.2 [CH_2], 40.6 [CH_2], 28.0 [CH_2], 24.1 [CH_3], 21.6 [d, $J^2_{\text{CF}} = 24$ Hz, CH_2], 16.9 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

MS (ESI+) m/z 407 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(5-fluoropent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**16c**)**

To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15c**, 130 mg, 0.311 mmol) in dichloromethane (2 mL) was slowly added dropwise 50 % v/v Deoxofluor® in toluene (0.29 mL, 0.684 mmol, 2.2 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred for 3 days at r.t. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (40 mL). The organic layer was washed with water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 99/1 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(5-fluoropent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*] pyrimidin-3-yl)acetamide (**16c**, 25 mg, 0.0591 mmol) as a light yellow powder (19 % yield). For analytical purposes only, compound **16c** was further purified using preparative HPLC (conditions A). Note that for the radiochemistry part, alternative HPLC conditions were developed (HPLC B, C, E and G).

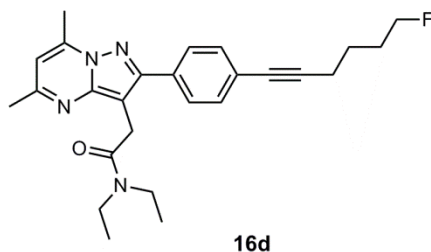
R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.54.

t_R : 30 min [HPLC A]; t_R : 10.5 min [HPLC B]; t_R : 9.5 min [HPLC C]; t_R : 2.20 min [HPLC E]; t_R : 9.5 min [HPLC G].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.47 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 4.62 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 3.97 (s, 2H, CH_2), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.76 (s, 3H, CH_3), 2.59 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.01 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.6$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.2$ & 6.0 Hz, CH_2), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.12 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.4 [C], 145.2 [C], 133.0 [C], 131.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 123.5 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 89.3 [C], 82.5 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 81.2 [C], 42.2 [CH_2], 40.6 [CH_2], 29.5 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 28.0 [CH_2], 24.3 [CH_3], 16.9 [CH_3], 15.4 [d, $J^3_{\text{CF}} = 4$ Hz, CH_2], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

MS (ESI+) m/z 421 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(6-fluorohex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (16d)**

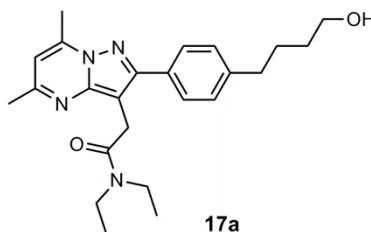
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(6-hydroxyhex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15d**, 86 mg, 0.199 mmol) in dichloromethane (2 mL) was slowly added dropwise 50 % v/v Deoxofluor® in toluene (0.20 mL, 0.470 mmol, 2.4 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred for 48 h at r.t. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (30 mL). The organic layer was washed with water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene/acetone: 90:10 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(6-fluorohex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl) acetamide (**16d**, 33 mg, 0.076 mmol) as a colorless oil (38 % yield).

R_f (toluene/acetone: 60/40 v/v): 0.52.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 7.46 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 4.52 (dt, 2H, *J*_{HF} = 47.2 Hz, *J*_{HH} = 6.0 Hz, CH₂F), 3.96 (s, 2H, CH₂), 3.50 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.42 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.75 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.50 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 1.89 (dt, 2H, *J*_{HF} = 25.6 Hz, *J*_{HH} = 7.2 & 6.0 Hz, CH₂), 1.75 (q⁵, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.9 [C], 147.5 [C], 146.0 [C], 132.7 [C], 131.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 123.8 [C], 108.3 [CH], 101.3 [C], 90.3 [C], 83.6 [d, *J*_{CF} = 164 Hz, CH₂], 81.1 [C], 42.2 [CH₂], 40.6 [CH₂], 29.5 [d, *J*_{CF} = 20 Hz, CH₂], 28.0 [CH₂], 24.4 [d, *J*_{CF} = 5 Hz, CH₂], 23.9 [CH₃], 19.1 [CH₂], 16.9 [CH₃], 14.2 [CH₃], 13.0 [CH₃].

MS (ESI+) *m/z* 435 [M+H]⁺.

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybutyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (17a)**

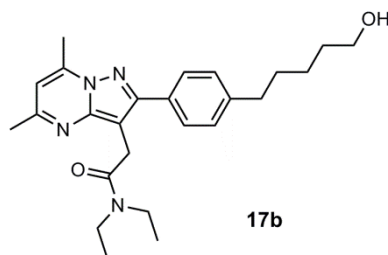
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15b**, 136 mg, 0.302 mmol) in dichloromethane (4 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal (10 mg, 3 mol %). The reaction flask was degassed under vacuum and filled with hydrogen at 1 atm. A 200 mL hydrogen balloon was fixed to the flask with a needle through the septum and the reaction mixture was stirred at r.t. for 24 h. The reaction mixture was then filtered on a silica pad and washed with a mixture of dichloromethane/methanol 80/20 v/v (200 mL). The filtrate was concentrated to dryness (30 °C, 300 mbar) and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97/3 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybutyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo [1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**17a**, 94 mg, 0.230 mmol) as a light yellow oil (76 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.26.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.71 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.25 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.50 (s, 1H), 3.91 (s, 2H, CH₂), 3.63 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 3.48 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.40 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.73 (s, 3H, CH₃), 2.67 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 2.62 (s, 3H, CH₃), 1.72 (q⁵, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 1.60 (q⁵, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 1.19 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.09 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 170.0 [C], 157.5 [C], 155.1 [C], 147.6 [C], 144.7 [C], 142.5 [C], 131.1 [C], 128.6 [2xCH], 128.5 [2xCH], 108.2 [CH], 100.9 [C], 62.6 [CH₂], 42.2 [CH₂], 40.5 [CH₂], 35.4 [CH₂], 32.2 [CH₂], 28.0 [CH₂], 27.4 [CH₂], 24.6 [CH₃], 16.9 [CH₃], 14.2 [CH₃], 13.0 [CH₃].

HRMS (ESI+) *m/z* 409.2620 [M+H]⁺ (calculated: 409.2604).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(5-hydroxypentyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (17b)**

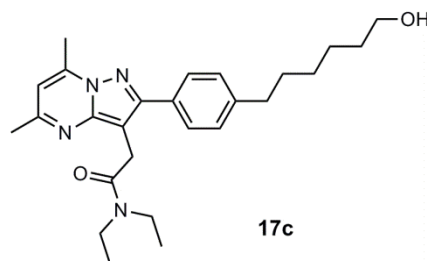
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15c**, 200 mg, 0.478 mmol) in dichloromethane (4 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal (20 mg, 4 mol %). The reaction flask was degassed under vacuum and filled with hydrogen at 1 atm. A 500 mL hydrogen balloon was fixed to the flask with a needle through the septum and the reaction mixture was stirred at r.t. for 72 h. The reaction mixture was then filtered on a silica pad and washed with a mixture of dichloromethane/methanol 80/20 v/v (200 mL). The filtrate was concentrated to dryness (30 °C, 300 mbar) and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 97/3 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(5-hydroxypentyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**17b**, 80 mg, 0.189 mmol) as a yellow oil (40 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 91/9 v/v): 0.43.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.71 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.26 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 4.00 (s, 2H, CH_2), 3.64 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.77 (s, 3H, CH_3), 2.67 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz, CH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3), 1.67 (q^5 , 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.60 (q^5 , 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.43 (m, 2H, CH_2), 1.20 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.9 [C], 157.4 [C], 154.8 [C], 147.8 [C], 145.0 [C], 142.7 [C], 131.0 [C], 128.6 [4xCH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 62.9 [CH_2], 42.2 [CH_2], 40.5 [CH_2], 35.6 [CH_2], 32.6 [CH_2], 31.1 [CH_2], 28.1 [CH_2], 25.2 [CH_2], 24.5 [CH_3], 16.9 [CH_3], 14.2 [CH_3], 13.0 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 423.2751 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 423.2760).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(6-hydroxyhexyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (17c)**

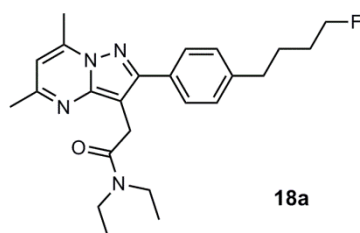
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(6-hydroxyhex-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15d**, 136 mg, 0.314 mmol) in dichloromethane (4 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal (80 mg, 22 mol %). The reaction flask was degassed under vacuum and filled with hydrogen at 1 atm. A 500 mL hydrogen balloon was fixed to the flask with a needle through the septum and the reaction mixture was stirred at r.t. for 12 h. The reaction mixture was then filtered on a silica pad and washed with a mixture of dichloromethane/methanol 80/20 v/v (200 mL). The filtrate was concentrated to dryness (30 °C, 300 mbar) and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97/3 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(6-hydroxyhexyl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**17c**, 99 mg, 0.226 mmol) as a light yellow gum (72 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.30.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.71 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.24 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.51 (s, 1H), 3.92 (s, 2H, CH_2), 3.61 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2), 3.48 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.64 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz, CH_2), 2.54 (s, 3H, CH_3), 1.64 (q^5 , 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2), 1.54 (q^5 , 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2), 1.34 (b, $w_{1/2} = 17$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.18 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.0 [C], 157.4 [C], 155.2 [C], 147.6 [C], 144.5 [C], 142.9 [C], 131.0 [C], 128.5 [4xCH], 108.2 [CH], 100.9 [C], 62.8 [CH_2], 42.2 [CH_2], 40.5 [CH_2], 35.6 [CH_2], 32.6 [CH_2], 31.3 [CH_2], 28.9 [CH_2], 28.0 [CH_2], 25.5 [CH_2], 24.5 [CH_3], 16.9 [CH_3], 14.2 [CH_3], 13.0 [CH_3].

HRMS (ESI+) m/z 437.2914 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calculated: 437.2917).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(4-fluorobutyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (18a)**

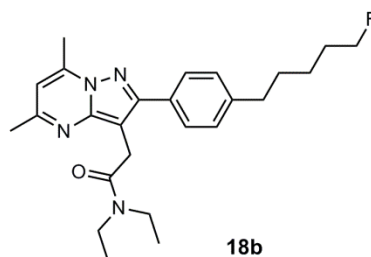
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxybutyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*] pyrimidin-3-yl)acetamide (**17a**, 70 mg, 0.171 mmol) in dichloromethane (2 mL) was slowly added dropwise a 50 % v/v Deoxofluor[®] solution in toluene (0.16 mL, 0.376 mmol, 2.2 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred for 48 h at r.t. Then, it was diluted with water (10 mL). The organic layer was isolated whereas the aqueous layer was extracted with dichloromethane (5 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 5 mL), brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97/3 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-fluorobutyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**18a**, 30 mg, 0.073 mmol) as a yellow oil (43 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.59.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.73 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.26 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 4.46 (dt, 2H, J²_{HF} = 47.2 Hz, J³_{HH} = 5.6 Hz, CH₂), 3.96 (s, 2H, CH₂), 3.50 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (d, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.75 (s, 3H, CH₃), 2.70 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃), 1.80-1.70 (m, 4H, 2xCH₂), 1.23 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 169.8 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 142.2 [C], 131.1 [C], 128.6 [2xCH], 128.5 [2xCH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 83.9 [d, J¹_{CF} = 163 Hz, CH₂], 42.2 [CH₂], 40.6 [CH₂], 35.1 [CH₂], 29.8 [d, J²_{CF} = 19 Hz, CH₂], 28.1 [CH₂], 26.8 [d, J³_{CF} = 5 Hz, CH₂], 24.1 [CH₃], 16.9 [CH₃], 14.2 [CH₃], 13.0 [CH₃].

HRMS (ESI+) *m/z* 411.2578 [M+H]⁺ (calculated: 411.2560).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(5-fluoropentyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (18b)**

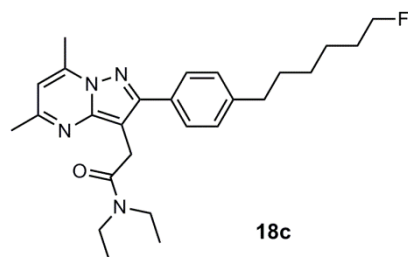
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypentyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*] pyrimidin-3-yl)acetamide (**17b**, 80 mg, 0.189 mmol) in dichloromethane (3 mL) was slowly added dropwise a 50 % v/v Deoxofluor[®] solution in toluene (0.18 mL, 0.423 mmol, 2.2 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred for 24 h at r.t. Then, it was diluted with water (10 mL). The organic layer was isolated whereas the aqueous layer was extracted with dichloromethane (5 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 5 mL), brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/acetone: 80/20 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(5-fluoropentyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**18b**, 44 mg, 0.104 mmol) as a colorless oil (55 % yield).

R_f (heptane/acetone: 50/50 v/v): 0.39.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.72 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.25 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.51 (s, 1H), 4.43 (dt, 2H, $J_{HF}^2 = 47.6$ Hz, $J_{HH}^3 = 6.0$ Hz, CH₂), 3.95 (s, 2H, CH₂), 3.49 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.74 (s, 3H, CH₃), 2.67 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH₂), 2.56 (s, 3H, CH₃), 1.80-1.65 (m, 4H, 2xCH₂), 1.46 (m, 2H, CH₂), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 169.8 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.8 [C], 145.1 [C], 142.6 [C], 131.0 [C], 128.6 [2xCH], 128.5 [2xCH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 84.0 [d, $J_{CF}^1 = 163$ Hz, CH₂], 42.2 [CH₂], 40.5 [CH₂], 35.5 [CH₂], 30.9 [CH₂], 30.2 [d, $J_{CF}^2 = 19$ Hz, CH₂], 28.1 [CH₂], 24.7 [d, $J_{CF}^3 = 6$ Hz, CH₂], 24.2 [CH₃], 16.9 [CH₃], 14.2 [CH₃], 13.0 [CH₃].

HRMS (ESI+) m/z 425.2718 [M+H]⁺ (calculated: 425.2717).

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(6-fluorohexyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (18c)**

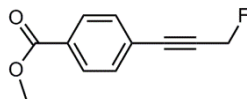
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxyhexyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**17c**, 70 mg, 0.160 mmol) in dichloromethane (2 mL) was slowly added dropwise a 50 % v/v Deoxofluor[®] solution in toluene (0.15 mL, 0.352 mmol, 2.2 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred for 48 h at r.t. Then, it was diluted with water (10 mL). The organic layer was isolated whereas the aqueous layer was extracted with dichloromethane (5 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 5 mL), brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 98/2 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(6-fluorohexyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**18c**, 41 mg, 0.093 mmol) as an orange oil (58 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.63.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.72 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.25 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.51 (s, 1H), 4.43 (dt, 2H, $J^2_{HF} = 47.6$ Hz, $J^3_{HH} = 6.0$ Hz, CH₂), 3.94 (s, 2H, CH₂), 3.49 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 2.74 (s, 3H, CH₃), 2.65 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH₂), 2.55 (s, 3H, CH₃), 1.75-1.62 (m, 4H, 2xCH₂), 1.45-1.30 (m, 4H, 2xCH₂), 1.20 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 169.9 [C], 157.4 [C], 155.5 [C], 147.3 [C], 145.0 [C], 142.8 [C], 130.9 [C], 128.5 [4xCH], 108.1 [CH], 101.0 [C], 84.1 [d, $J^1_{CF} = 163$ Hz, CH₂], 42.2 [CH₂], 40.5 [CH₂], 35.6 [CH₂], 31.2 [CH₂], 30.3 [d, $J^2_{CF} = 19$ Hz, CH₂], 28.7 [CH₂], 28.1 [CH₂], 25.0 [d, $J^3_{CF} = 5$ Hz, CH₂], 24.2 [CH₃], 16.9 [CH₃], 14.2 [CH₃], 13.0 [CH₃].

HRMS (ESI+) m/z 439.2889 [M+H]⁺ (calculated: 439.2873).

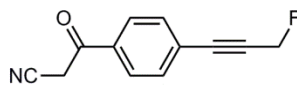
Methyl 4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)benzoate (19)**19**

To a solution of methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (**1**, 1.88 g, 9.88 mmol) in dichloromethane (40 mL) was added dropwise under vigorous stirring a 50 % v/v Deoxofluor[®] solution in toluene (8.40 mL, 19.7 mmol, 2.0 eq) at r.t. Then, the reaction mixture was stirred overnight at r.t. The mixture was then concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL). The organic layer was washed with water (2 x 50 mL) and brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/acetone: 85/15 v/v) to afford pure methyl 4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)benzoate (**19**, 0.560 g, 2.91 mmol) as a light yellow crystallized solid (30 % yield).

R_f (heptane/acetone: 2/1 v/v): 0.44.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.01 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ph), 7.53 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ph), 5.20 (d, 2H, J²_{HF} = 47.6 Hz, CH₂F), 3.92 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.3 [C], 131.6 [2xCH], 130.2 [C], 129.4 [2xCH], 126.2 [d, J⁴_{CF} = 4 Hz, C], 88.5 [d, J³_{CF} = 12 Hz, C], 85.2 [d, J²_{CF} = 17 Hz, C], 70.8 [d, J¹_{CF} = 165 Hz, CH₂], 52.2 [CH₃].

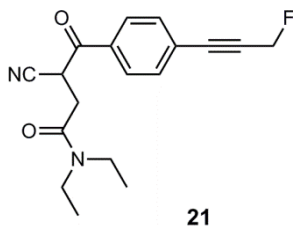
3-(4-(3-Fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (20)**20**

To an airtight flask under argon containing anhydrous tetrahydrofuran (4 mL) cooled at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liquid nitrogen/acetone bath) was carefully added a 1.6 M *n*-butyllithium solution in hexanes (4.80 mL, 7.68 mmol, 2.0 eq). A solution of acetonitrile (1.00 mL, 19.3 mmol, 5.0 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (4 mL) was cautiously added dropwise while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 15 min at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, a solution of methyl 4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)benzoate (**19**, 735 mg, 3.82 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (6 mL) was added to the mixture while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. After the addition, the content was stirred for 30 min at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with water (50 mL) at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. The mixture was acidified with 1 M aqueous HCl solution to pH 1 and it was extracted twice with ethyl acetate (2 x 20 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 mbar) to afford 3-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**20**, 708 mg, 3.52 mmol) as a yellow solid (92 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v): 0.39.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.89 (d, 2H, $J = 8.4\text{ Hz}$, Ph), 7.60 (d, 2H, $J = 8.4\text{ Hz}$, Ph), 5.21 (d, 2H, $J_{\text{HF}} = 47.2\text{ Hz}$, CH_2F), 4.08 (s, 2H, CH_2CN).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 186.3 [C], 133.9 [C], 132.3 [2xCH], 128.3 [2xCH], 128.2 [d, $J_{\text{CF}}^4 = 4\text{ Hz}$, C], 113.5 [C], 87.8 [d, $J_{\text{CF}}^3 = 12\text{ Hz}$, C], 86.9 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 21\text{ Hz}$, C], 70.7 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 166\text{ Hz}$, CH_2], 29.4 [CH_2].

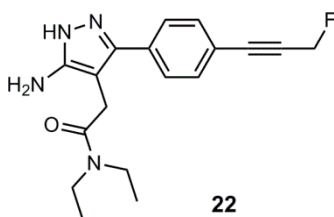
3-Cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-4-oxobutanamide (21)

To a suspension of 3-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**20**, 688 mg, 3.42 mmol) in a mixture of ethanol (35 mL) and water (5 mL) was added in one portion and under vigorous stirring sodium hydroxide (150 mg, 3.75 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred for 15 min. Then, sodium iodide (1.03 g, 6.87 mmol, 2.0 eq) and *N,N*-diethylchloroacetamide (0.47 mL, 3.43 mmol, 1.0 eq) were added to the mixture which was stirred for 24 h at r.t. Then, the reaction mixture was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (25 mL) and water (25 mL) which was acidified with a 37 % aqueous HCl solution to pH 1. The organic layer was separated, washed twice with water (2 x 20 mL), brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 98.5/1.5 v/v) to afford pure 3-cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-4-oxobutanamide (**21**, 504 mg, 1.60 mmol) as a colorless oil (47 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.02 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 7.60 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 5.20 (d, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 47.6$ Hz, CH_2F), 4.99 (dd, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, CH), 3.46-3.27 (m, 5H, $\text{CHH}' + 2\times\text{CH}_2$), 2.89 (dd, 1H, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz, CHH'), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 188.8 [C], 166.8 [C], 134.0 [C], 132.2 [2xCH], 128.8 [2xCH], 127.8 [d, $J_{\text{CF}}^4 = 4$ Hz, C], 116.8 [C], 88.1 [d, $J_{\text{CF}}^3 = 12$ Hz, C], 86.5 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 21$ Hz, C], 70.8 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 166$ Hz, CH_2], 42.0 [CH_2], 40.6 [CH_2], 33.8 [CH], 32.7 [CH_2], 14.0 [CH_3], 12.9 [CH_3].

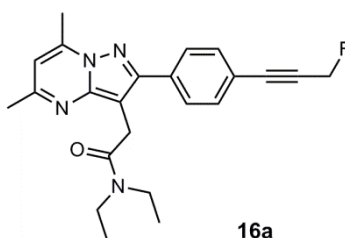
2-(5-Amino-3-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N,N-diethylacetamide (22)

To a solution of 3-cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-4-oxobutanamide (**21**, 287 mg, 0.913 mmol) in ethanol (6 mL) was added dropwise at r.t. monohydrated hydrazine (134 μ L, 2.74 mmol, 3 eq) and glacial acetic acid (91 μ L, 1.59 mmol, 1.7 eq). The reaction mixture was heated at 80 °C for 3 h. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (40 mL). The organic layer was then washed with a saturated potassium carbonate aqueous solution (10 mL), water (3 x 20 mL) and brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 97/3 to 96/4 v/v) to afford 2-(5-amino-3-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**22**, 102 mg, 0.31 mmol) as an amber gum (34 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.22.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.46 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 5.52 (b, 3H, *w*_{1/2} = 35 Hz, NH₂ + NH), 5.19 (d, 2H, *J*_{HF}² = 47.6 Hz, CH₂F), 3.49 (s, 2H, CH₂), 3.31 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.06 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.07 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 0.93 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 170.0 [C], 153.4 [C], 142.7 [C], 132.2 [2xCH], 131.4 [C], 127.6 [2xCH], 121.7 [d, *J*_{CF}⁴ = 4 Hz, C], 97.6 [C], 88.8 [d, *J*_{CF}³ = 12 Hz, C], 83.7 [d, *J*_{CF}² = 21 Hz, C], 71.0 [d, *J*_{CF}¹ = 164 Hz, CH₂], 42.3 [CH₂], 40.6 [CH₂], 28.3 [CH₂], 14.0 [CH₃], 12.9 [CH₃].

***N,N*-Diethyl-2-(2-[4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)-phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (16a)**

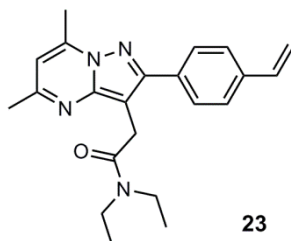
To a solution of 2-(5-amino-3-(4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethyl acetamide (**22**, 107 mg, 0.326 mmol) in absolute ethanol (5 mL) was slowly added at room temperature acetylaceton (67 μ L, 0.687 mmol, 2.1 eq). The reaction mixture was refluxed for 5 h and then concentrated to dryness (40 °C, 20 mbar). The resulting crude material was triturated in cold diethyl ether (3 mL) and collected on a Büchner funnel. The product was further washed with cold diethyl ether (2 x 2 mL) and suck-dried under vacuum to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-[4-(3-fluoroprop-1-yn-1-yl)-phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl) acetamide (**16a**, 84 mg, 0.214 mmol) as a white powder (66 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.42.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.83 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.55 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.55 (s, 1H), 5.20 (d, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 47.6$ Hz, CH_2F), 3.95 (s, 2H, CH_2), 3.52 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 169.7 [C], 157.7 [C], 154.2 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 134.4 [C], 131.9 [2xCH], 128.5 [2xCH], 121.5 [d, $J_{\text{CF}}^4 = 4$ Hz, C], 108.5 [CH], 101.4 [C], 89.5 [d, $J_{\text{CF}}^3 = 12$ Hz, C], 83.2 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 22$ Hz, C], 71.1 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 164$ Hz, CH_2], 42.3 [CH_2], 40.6 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.4 [CH_3], 16.8 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

MS (ESI+) m/z 393 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

2-(5,7-Dimethyl-2-(4-vinylphenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (23)

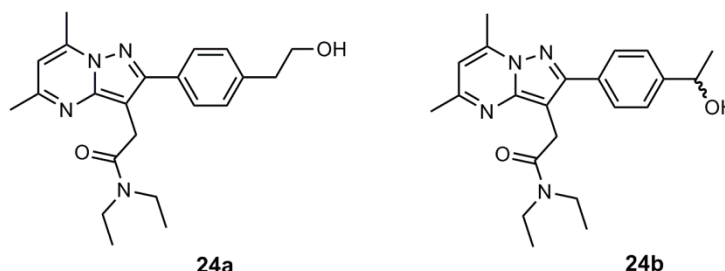
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**14**, 1.0 g, 2.16 mmol) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (6 mL) was added palladium bis(triphenylphosphine)dichloride (24 mg, 0.034 mmol, 1.6 mol %). The flask was degassed under vacuum and filled with argon and then anhydrous lithium chloride (367 mg, 8.63 mmol, 4.0 eq) (pre-weighed and stored at 80 °C) was rapidly added under argon. The reaction mixture was stirred at r.t. for 15 min. Tributylvinyltin (570 μ L, 1.95 mmol, 0.9 eq) was carefully added dropwise through a septum and then, the reaction mixture was stirred at r.t. for 48 h. Once complete, the reaction mixture was quenched with water (40 mL) and the resulting heterogeneous mixture was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). The organic layers were combined, washed with water (3 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered over cotton to remove tin salts and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was triturated in cold diethylether (5 mL) and filtered on a Büchner funnel. The resulting solid was washed with cold diethylether (2 x 2 mL) and suck-dried to afford pure 2-(5,7-dimethyl-2-(4-vinylphenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**23**, 594 mg, 1.64 mmol) as a shiny beige powder (76 % yield).

R_f (toluene/acetone: 60/40 v/v): 0.40.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.80 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.49 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.76 (dd, 1H, $J^3_{\text{HH trans}} = 17.6$ Hz, $J^3_{\text{HH cis}} = 11.2$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.53 (s, 1H), 5.80 (d, 1H, $J^3_{\text{HH trans}} = 17.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.28 (d, 1H, $J^3_{\text{HH cis}} = 11.2$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.98 (s, 2H, CH_2), 3.51 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.76 (s, 3H, CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.12 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.7 [C], 157.5 [C], 155.2 [C], 146.8 [C], 145.7 [C], 137.5 [C], 136.5 [CH], 132.9 [C], 128.7 [2xCH], 126.3 [2xCH], 114.1 [CH_2], 108.2 [CH], 101.2 [C], 42.2 [CH_2], 40.6 [CH_2], 28.1 [CH_2], 24.1 [CH_3], 16.9 [CH_3], 14.2 [CH_3], 13.0 [CH_3].

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (24a) ; *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(1-hydroxyethyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (24b)**



To a solution of 2-(5,7-dimethyl-2-(4-vinylphenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethyl acetamide (**23**, 20 mg, 0.055 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (1 mL) cooled at 0 °C was added dropwise a 1 M BH₃ solution in tetrahydrofuran (150 µL, 0.150 mmol, 2.7 eq). The reaction mixture was stirred for 15 min at 0 °C and then, it was left under stirring at r.t. overnight. Once completed (TLC monitoring), the reaction was carefully quenched at 0 °C with a 1 M NaOH aqueous solution (166 µL, 0.166 mmol, 3 eq) followed by the addition of 30 % aqueous H₂O₂ (20 µL, 0.196 mmol, 3.5 eq). The mixture was stirred for 30 min at 0 °C and 30 min at r.t. Then, it was diluted with water (20 mL) and extracted twice with ethyl acetate (2 x 10 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 5 mL) and brine (5 mL), dried over sodium sulfate and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97/3 v/v) to afford a mixture of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**24a**) and its regioisomer *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(1-hydroxyethyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**24b**) (**24a/24b** 3:1 based on ¹H-NMR, 12 mg, 0.031 mmol) as a colorless oil (57 % yield).

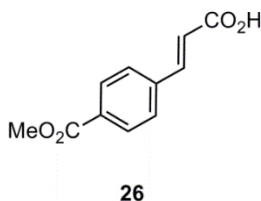
R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.26.

24a (desired isomer, 75 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.73 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ph), 7.33 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ph), 6.60 (s, 1H), 4.16 (s, 2H, CH₂), 3.88 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂), 3.53 (q, 2H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (q, 2H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 3.09 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂), 2.83 (s, 3H, CH₃), 2.73 (s, 3H, CH₃), 1.25 (t, 3H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 1.13 (t, 3H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃).

24b (branched isomer, 25 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.46 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.60 (s, 1H), 4.95 (q, 1H, J = 6.4 Hz, CH), 4.16 (s, 2H, CH₂), 3.53 (q, 2H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (q, 2H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 2.83 (s, 3H, CH₃), 2.73 (s, 3H, CH₃), 1.51 (d, 3H, J = 6.4 Hz, CH₃), 1.25 (t, 3H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 1.13 (t, 3H, J = 6.8 Hz, NCH₂CH₃).

(E)-3-(4-(Methoxycarbonyl)phenyl)acrylic acid (26)

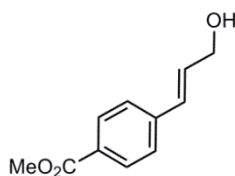
To a solution of methyl 4-formylbenzoate (4 g, 24.4 mmol) in a mixture of pyridine (20 mL) and pyrrolidine (2 mL) was added malonic acid (6.4 g, 61.5 mmol, 2.5 eq) in one portion. The mixture was heated 1 h at 60 °C, then 1 h at 100 °C and left overnight at r.t. under stirring. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with water (60 mL) and the mixture was acidified with a 37 % aqueous hydrochloric acid solution to pH 2-3. An abundant white solid was immediately formed. It was collected on a Büchner funnel, washed with iced water (2 x 20 mL), suck-dried and oven-dried for 30 min at 80 °C to afford (*E*)-3-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)acrylic acid (**26**, 4.68 g, 22.7 mmol) as an off white solid (91 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 90/10 v/v): 0.56.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2 , 400 MHz): δ 8.04 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 7.70 (d, 1H, $J^3_{\text{HH trans}} = 16.0$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.64 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 6.53 (d, 1H, $J^3_{\text{HH (trans)}} = 16.0$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.91 (s, 3H, CH_3).

Analytical data were in concordance with previously reported results.¹³⁹

¹³⁹ Y. Nagao, K. Inoue, M. Yamaki, S. Takagi, E. Fujita. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 495.

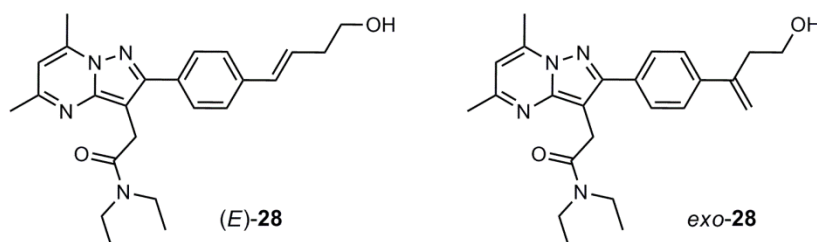
(E)-methyl 4-(3-hydroxyprop-1-en-1-yl)benzoate (27)**27**

To a solution of (*E*)-3-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)acrylic acid (**26**, 4.00 g, 19.4 mmol) in tetrahydrofuran (50 mL) was added triethylamine (5.4 mL, 39.0 mmol, 2 eq). The reaction mixture was cooled at 0 °C and diethylchlorophosphate (3.4 mL, 23.4 mmol, 1.2 eq) was cautiously added dropwise. The reaction mixture was stirred for 3 h at r.t. and then filtered on a Büchner funnel. The filtrate was concentrated to dryness (50 mbar, 35 °C) and the residue was diluted in tetrahydrofuran (30 mL). To the solution was added a NaBH₄ suspension (0.74 g, 19.5 mmol, 1 eq) in tetrahydrofuran (10 mL). The reaction mixture was stirred for 8 h at r.t. Then, it was slowly quenched with methanol (10 mL) and concentrated to dryness (50 mbar, 40 °C). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 v/v) to afford (*E*)-methyl 4-(3-hydroxyprop-1-en-1-yl)benzoate (**27**, 1.08 g, 5.6 mmol) as a colorless oil (29 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.67.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.97 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.42 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.65 (d, 1H, J^{3_{HH trans}} = 16.4 Hz, CH=CH), 6.50-6.43 (m, 1H, CH=CH), 4.35 (d, 2H, J = 4.0 Hz, CH₂), 3.90 (s, 3H, CH₃).

(*E*)-*N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-en-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide ((*E*)-28) ; *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-en-2-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (*exo*-28)



To a mixture of tetrahydrofuran and water (3.3 mL, 10/1 v/v) was introduced but-3-yn-1-ol (49 μ L, 0.648 mmol, 1.5 eq), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (5 mg, 1 mol%), tributyltin chloride (200 μ L, 0.738 mmol, 1.7 eq), poly(methylhydrosiloxane) (PMHS) (44 μ L, 0.733 mmol, 1.7 eq), potassium fluoride (50 mg, 0.862 mmol, 2 eq) and a 1 M tetrabutylammonium fluoride aqueous solution (20 μ L, 0.020 mmol, 0.05 eq). The reaction mixture was heated at 80 $^{\circ}$ C for 15 min. Then, *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**14**, 200 mg, 0.433 mmol) was added in one portion to the mixture which was further heated at 80 $^{\circ}$ C for 30 min. Once the reaction completed (TLC monitoring), the reaction was quenched with a saturated sodium fluoride aqueous solution (3 mL). The mixture was stirred for 30 min at r.t. and diluted with water (20 mL). Then, it was extracted twice with diethylether (2 x 20 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate and concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97/3 v/v) to afford a 48/52 (based on 1 H-NMR) mixture of (*E*)-*N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-en-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide ((*E*)-28) and *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxybut-1-en-2-yl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (*exo*-28) (131 mg, 0.323 mmol) as a shiny white foam (74 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.37.

(*E*)-28

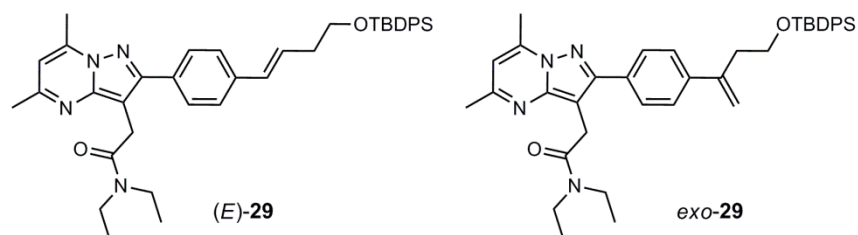
1 H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 7.43 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 6.51 (s, 1H), 6.48 (d, 1H, *J*^{3_{HH}} = 16.0 Hz, Ar-CH=CH), 6.26 (dt, 1H, *J*^{3_{HH}} = 16.0 & 6.8 Hz, CH=CH-CH₂), 3.98 (s, 2H, CH₂), 3.76 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 3.51 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.76 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.50 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 1.22 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.12 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

exo-28

1 H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.81 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 7.50 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 6.51 (s, 1H), 5.46 (s, 1H, C=CHH'), 5.19 (s, 1H, C=CHH'), 3.98 (s, 2H, CH₂), 3.74 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 3.51 (q,

2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.81 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH_2), 2.76 (s, 3H, CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.12 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

(*E*)-2-(2-(4-(4-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)but-1-en-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide ((*E*)-29) ; 2-(2-(4-(4-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)but-1-en-2-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (*exo*-29)



To a solution of the 48/52 (*E*)-28/*exo*-28 mixture (100 mg, 0.246 mmol) in pyridine (2 mL) was added a catalytic amount of DMAP. *tert*-Butylchlorodiphenylsilane (TBDPSCl) (77 μ L, 0.295 mmol, 1.2 eq) was added portionwise to the mixture which was stirred overnight at r.t. Once completed (TLC monitoring), the reaction mixture was diluted with a 2 M aqueous hydrochloric acid solution (20 mL) and extracted twice with ethyl acetate (2 x 10 mL). The organic layers were combined, washed with water (3 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate and concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 50 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 98/2 to 97/3 v/v) to afford a 48/52 mixture (based on 1 H-NMR) of (*E*)-2-(2-(4-(4-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)but-1-en-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethyl acetamide ((*E*)-29) and 2-(2-(4-(4-((*tert*-butyldiphenyl silyl)oxy)but-1-en-2-yl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethyl acetamide (*exo*-29) (45 mg, 0.070 mmol) as a colorless oil (28 % yield). Some starting material was also recovered (24 mg, 0.060 mmol).

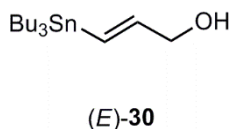
R_f (dichloromethane/methanol: 96/4 v/v): 0.28.

(*E*)-29

1 H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.78-7.61 (m, 4H, Ph), 7.45-7.32 (m, 10H, Ph), 6.53 (s, 1H), 6.45 (d, 1H, $J^3_{\text{HH}} = 16.0$ Hz, Ar-CH=CH), 6.28 (dt, 1H, $J = 16.0$ & 6.8 Hz, CH=CH-CH₂), 3.98 (s, 2H, CH₂), 3.81 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 3.42 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 2.77 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.49 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 1.12 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 1.08 (s, 9H, 3xCH₃).

exo-29

1 H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.78-7.61 (m, 4H, Ph), 7.45-7.32 (m, 10H, Ph), 6.53 (s, 1H), 5.39 (s, 1H, C=CHH'), 5.11 (s, 1H, C=CHH'), 3.97 (s, 2H, CH₂), 3.79 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 3.42 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 2.80 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 2.77 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 1.12 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 1.08 (s, 9H, 3xCH₃).

(E)-3-(Tributylstannyl)prop-2-en-1-ol ((E)-30)

To a mixture of prop-2-yn-1-ol (0.50 mL, 8.59 mmol) and tributyltin hydride (3.0 mL, 11.0 mmol, 1.3 eq) maintained under argon was cautiously added 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN, 70 mg, 0.426 mmol, 0.05 eq). The reaction mixture was gradually heated to 80 °C for 2 h (5 °C per min). It is extremely important not to heat the mixture too rapidly to avoid AIBN decomposition and possible explosion. Once the reaction completed, the mixture was directly subjected to flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10 v/v) to afford (*E*)-3-(tributylstannyl)prop-2-en-1-ol ((*E*)-**30**, 257 mg, 0.740 mmol) as a colorless oil (9 % yield). A 56/44 mixture (based on ¹H-NMR) (84 mg, 0.242 mmol) of (*Z*)-3-(tributylstannyl)prop-2-en-1-ol ((*Z*)-**30**) and 2-(tributylstannyl)prop-2-en-1-ol (*exo*-**30**) was also isolated.

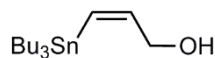
R_f(petroleum ether/ethyl acetate: 90/10 v/v): 0.26.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.17 (m, 2H, CH=CH), 4.17 (dd, 2H, J = 5.6 & 3.6 Hz, CH₂), 1.53-1.45 (m, 6H, 3xCH₂), 1.35-1.26 (m, 6H, 3xCH₂), 0.96-0.80 (m, 15 H, 3xCH₂ + 3xCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 146.9 [s, CH], 128.2 [s, CH, ^{119/117}Sn satellites J¹_{Sn-C} ¹¹⁹Sn 371 Hz ¹¹⁷Sn 353 Hz], 66.3 [s, CH₂, ^{119/117}Sn satellites J³_{Sn-C} = 65 Hz], 29.1 [s, 3xCH₂, Sn satellites J³_{Sn-C} ¹¹⁹Sn 33 Hz ¹¹⁷Sn 20 Hz], 27.2 [s, 3xCH₂, Sn satellites J²_{Sn-C} ¹¹⁹Sn 88 Hz ¹¹⁷Sn 55 Hz], 13.6 [s, 3xCH₃], 9.3 [s, 3xCH₂, Sn satellites J¹_{Sn-C} ¹¹⁹Sn 343 Hz ¹¹⁷Sn 327 Hz].

Analytical data were in concordance with previously reported results.¹⁴⁰

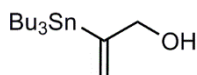
¹⁴⁰ M.-T. Lai, D. Li, E. Oh, H.-W. Liu. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 1627.

(Z)-3-(Tributylstannyl)prop-2-en-1-ol ((Z)-30)**(Z)-30**

R_f (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10 v/v): 0.40

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.69 (dt, 1H, $J = 12.8$ & 5.6 Hz, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^3_{\text{Sn-H}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 144 Hz ^{117}Sn 119 Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.07 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^2_{\text{Sn-H}} = 64.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.11 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, CH_2), 1.54-1.44 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.36-1.26 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.00-0.85 (m, 15H, $3\times\text{CH}_2 + 3\times\text{CH}_3$).

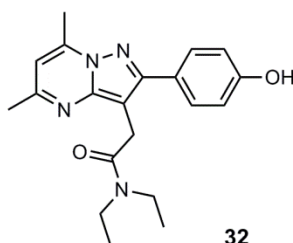
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 146.2 [CH], 131.8 [CH], 66.1 [s, CH_2 , $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^3_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 45 Hz ^{117}Sn 38 Hz], 29.2 [$3\times\text{CH}_2$], 27.3 [s, $3\times\text{CH}_2$, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^2_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 65 Hz ^{117}Sn 50 Hz], 13.7 [$3\times\text{CH}_3$], 10.6 [s, $3\times\text{CH}_2$, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^1_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 343 Hz ^{117}Sn 329 Hz].

2-(Tributylstannyl)prop-2-en-1-ol (*exo*-30)***exo*-30**

R_f (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10 v/v): 0.40

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.88 (d, 1H, $J^2_{\text{H-H}} = 2.0$ Hz, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^3_{\text{Sn-H}} = 130.4$ Hz, CHH'), 5.24 (d, 1H, $J^2_{\text{H-H}} = 2.0$ Hz, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^3_{\text{Sn-H}} = 61.2$ Hz, CHH'), 4.28 (dt, 2H, $J = 5.6$ & 2.0 Hz, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^3_{\text{Sn-H}} = 28.4$ Hz, CH_2), 1.54-1.44 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.36-1.26 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.00-0.85 (m, 15H, $3\times\text{CH}_2 + 3\times\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 154.7 [C], 122.9 [CH_2], 69.6 [s, CH_2 , $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^2_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 53 Hz ^{117}Sn 40 Hz], 29.1 [$3\times\text{CH}_2$], 27.3 [s, $3\times\text{CH}_2$, Sn satellites $J^2_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 65 Hz ^{117}Sn 50 Hz], 13.7 [$3\times\text{CH}_3$], 9.41 [s, $3\times\text{CH}_2$, Sn satellites $J^1_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 338 Hz ^{117}Sn 322 Hz].

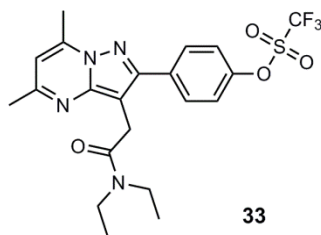
***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (32)**

To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**DPA-713**, 3.00 g, 8.19 mmol) in dichloromethane (75 mL) cooled at -60 °C (liquid nitrogen/acetone bath) was cautiously added under argon a 1 M boron trichloride solution in dichloromethane (33 mL, 33.0 mmol, 4.0 eq) with a syringe in five portions (4 x 8 mL and 1 mL) over 20 min. The reaction mixture was stirred 1 h at -25 °C then 1 h at -10 °C. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with methanol (10 mL) and diluted with water (50 mL). The resulting bright yellow precipitate was filtered on a Büchner funnel, washed with cold acetone (20 mL) and cold diethyl ether (2 x 10 mL), and suck-dried under vacuum to afford *N,N*-diethyl-2-(2-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**32**, 3.02 g, 8.57 mmol) as a bright yellow solid (quantitative yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 98/2 v/v): 0.30.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.56 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.82 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.78 (s, 1H), 3.79 (s, 2H, CH_2), 3.48 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3), 3.27 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3), 2.65 (s, 3H, CH_3), 2.45 (s, 3H, CH_3), 1.15 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3), 1.00 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 169.5 [C], 158.1 [C], 157.5 [C], 154.3 [C], 147.4 [C], 145.0 [C], 129.7 [2xCH], 124.6 [C], 115.6 [2xCH], 108.5 [CH], 100.7 [C], 42.0 [CH_2], 40.3 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.5 [CH_3], 16.7 [CH_3], 14.6 [CH_3], 13.5 [CH_3].

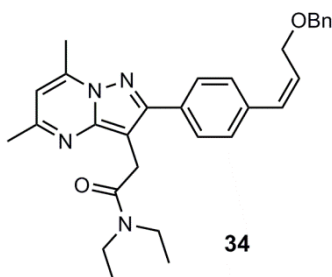
4-(3-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyltrifluoromethanesulfonate (33)**33**

To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**32**, 500 mg, 1.42 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added triethylamine in one portion (0.39 mL, 2.82 mmol, 2.0 eq). The reaction mixture was cooled to 0 °C and a 1 M solution of trifluoromethanesulfonic anhydride in dichloromethane (1.56 mL, 1.56 mmol, 1.1 eq) was cautiously added dropwise. The reaction mixture was stirred for 15 min at 0 °C and left overnight under stirring at r.t. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with iced water (50 mL) and stirred for 5 min. Then, the reaction mixture was acidified with a 37 % aqueous hydrochloric acid solution to pH 1 and the organic layer was extracted with diethyl ether (2 x 25 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 20 mL), brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 600 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 98/2 v/v) to afford 4-(3-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl trifluoromethane sulfonate (**33**, 547 mg, 1.13 mmol) as white crystals which were stored under argon at -28 °C (79 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 92/8 v/v): 0.42.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.00 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.35 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.57 (s, 1H), 3.94 (s, 2H, CH_2), 3.55 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.25 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

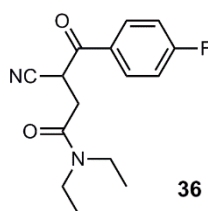
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.6 [C], 157.9 [C], 153.7 [C], 149.6 [C], 146.6 [C], 145.7 [C], 134.1 [C], 130.6 [2xCH], 121.3 [2xCH], 118.7 [q, $J^1_{\text{CF}} = 319$ Hz, C], 108.6 [CH], 101.6 [C], 42.3 [CH_2], 40.7 [CH_2], 27.8 [CH_2], 24.1 [CH_3], 16.9 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

(Z)-2-(2-(4-(3-(Benzyloxy)prop-1-en-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (34)

To a solution of 2-(2-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**7**, 50 mg, 0.104 mmol) in a 1:1 mixture of methanol and dichloromethane (1 mL) was added quinoline (1 μ L, 0.0085 mmol, 8 mol%) and Lindlar catalyst (5 % Pd wt. on CaCO_3 poisoned with lead) (2.5 mg, 1 mol %). The vial was filled with hydrogen at 1 atm and the reaction mixture was stirred for 24 h at r.t. Then, the suspension was filtered on a pad of silica gel and washed with a dichloromethane/methanol 90:10 v/v mixture (100 mL). The filtrate was concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar) and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 98/2 v/v) to afford (Z)-2-(2-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-en-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**34**, 27 mg) as a colorless oil. The collected product contained approximately 20 % of (*E*)-2-(2-(4-(3-(benzyloxy)prop-1-en-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide and 10 % of the saturated alkane according to ^1H -NMR spectra.

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.38.

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.82 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.38-7.26 (m, 7H, Ph), 6.66 (d, 1H, $J^3_{\text{HH}} = 11.6$ Hz, Ar-CH=CH), 6.52 (s, 1H), 5.94 (dt, 1H, $J^3_{\text{HH}} = 11.6$ & 6.4 Hz, CH=CH-CH₂), 4.51 (s, 2H, CH₂), 4.35 (d, 2H, $J^3_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, CH₂), 3.92 (s, 2H, CH₂), 3.51 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 2.65 (s, 3H, CH₃), 2.55 (s, 3H, CH₃), 1.21 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃).

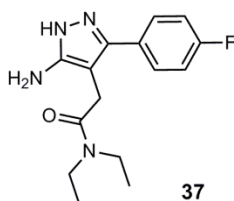
3-Cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutanamide (36)

To a suspension of 3-(4-fluorophenyl)-3-oxopropanenitrile (5.00 g, 30.6 mmol) in a mixture of ethanol (230 mL) and water (10 mL) was added portionwise and under vigorous stirring sodium hydroxide (1.30 g, 32.5 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred for 15 min at r.t. and then sodium iodide (9.20 g, 61.3 mmol, 2.0 eq) was added in one portion, followed by *N,N*-diethylchloroacetamide (4.20 mL, 30.6 mmol) which was slowly added dropwise. The reaction mixture was stirred for about 2 days. Once the reaction finished (based on TLC analysis), the suspension was filtered on a Büchner funnel to remove inorganic salt and the filtrate was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar). The crude material was then partitioned between ethyl acetate (400 mL) and water (200 mL) which was acidified with a 37 % aqueous hydrochloric acid solution to pH 1. The organic layer was separated and then washed with water (2 x 100 mL), brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 98/2 v/v) to afford pure 3-cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutanamide (**36**, 4.45 g, 16.1 mmol) as a light yellow oil (53 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 30/70 v/v): 0.40

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.10 (dd, 2H, $J = 8.8$ & 5.2 Hz, Ph), 7.19 (t, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ph), 5.00 (dd, 1H, $J = 9.6$ & 4.4 Hz, CH), 3.45-3.29 (m, 5H, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3 + \text{CHH}'$), 2.88 (dd, 1H, $J = 16.0$ & 4.4 Hz, CHH'), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.08 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 188.0 [C], 166.9 [C], 166.4 [d, $J^1_{\text{CF}} = 255$ Hz, C], 131.7 [d, $J^3_{\text{CF}} = 10$ Hz, $2 \times \text{CH}$], 130.7 [d, $J^4_{\text{CF}} = 3$ Hz, C], 116.9 [C], 116.2 [d, $J^2_{\text{CF}} = 22$ Hz, $2 \times \text{CH}$], 42.0 [CH_2], 40.6 [CH_2], 33.7 [CH], 32.6 [CH_2], 14.0 [CH_3], 12.9 [CH_3].

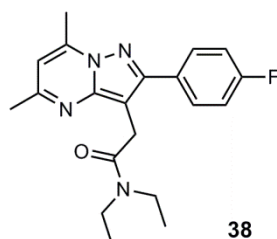
2-(5-Amino-3-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N,N-diethylacetamide (37)

To a solution of 3-cyano-*N,N*-diethyl-4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutanamide (**36**, 4.39 g, 15.9 mmol) in ethanol (80 mL) were added dropwise at r.t. monohydrated hydrazine (2.4 mL, 49.0 mmol, 3.1 eq) and glacial acetic acid (1.62 mL, 28.2 mmol, 1.8 eq). The reaction mixture was heated at 80 °C for 5 h. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (75 mL) and a 0.20 M sodium hydroxide aqueous solution (25 mL). The organic layer was separated, washed twice with water (2 x 50 mL) and brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was triturated in iced dichloromethane (10 mL) and the resulting solid was filtered on a Büchner funnel, washed with iced dichloromethane (2 x 5 mL) and suck-dried under vacuum to afford 2-(5-amino-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**37**, 1.48 g, 5.10 mmol) as an off-white crystalline powder (32 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.18.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.35 (dd, 2H, $J^3_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, $J^4_{\text{HF}} = 5.6$ Hz, Ph), 7.07 (t, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 8.8$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, Ph), 6.13 (bs, 3H, $w_{1/2} = 69$ Hz, $\text{NH}_2 + \text{NH}$), 3.46 (s, 2H, CH_2), 3.31 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.04 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.06 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 0.91 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.2 [C], 162.6 [d, $J^1_{\text{CF}} = 246$ Hz, C], 153.3 [C], 142.7 [C], 129.7 [d, $J^3_{\text{CF}} = 7$ Hz, 2xCH], 127.1 [C], 115.8 [d, $J^2_{\text{CF}} = 22$ Hz, 2xCH], 97.3 [C], 42.3 [CH_2], 40.5 [CH_2], 28.3 [CH_2], 14.0 [CH_3], 12.9 [CH_3].

***N,N*-Diethyl-2-(2-(4-fluorophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (38)**

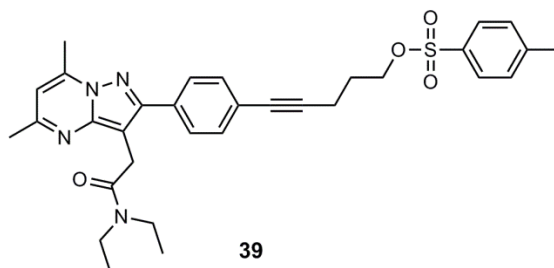
To a solution of 2-(5-amino-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**37**, 1.00 g, 3.44 mmol) in ethanol (20 mL) was added dropwise acetylacetone (566 μ L, 5.51 mmol, 1.6 eq) at r.t. The reaction mixture was refluxed for 3h30 and monitored by TLC. Acetylacetone (200 μ L, 1.95 mmol, 0.6 eq) was once more added dropwise and the mixture was refluxed for additional 2 h to complete the reaction. Then, the reaction mixture was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 98/2 v/v) to afford pure *N,N*-diethyl-2-(2-(4-fluorophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**38**, 0.917 g, 2.59 mmol) as bright yellow crystals (75 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.46.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.82 (dd, 2H, $J_{\text{HH}}^3 = 8.4$ Hz, $J_{\text{HF}}^3 = 5.6$ Hz, Ph), 7.13 (t, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 3.91 (s, 2H, CH_2), 3.51 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.73 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3), 1.21 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.8 [C], 164.2 [C], 161.8 [C], 157.6 [C], 154.6 [C], 146.1 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 130$ Hz, C], 130.5 [d, $J_{\text{CF}}^3 = 8$ Hz, 2xCH], 129.6 [C], 115.4 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 22$ Hz, 2xCH], 108.2 [CH], 101.1 [C], 42.3 [CH_2], 40.6 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.1 [CH_3], 16.8 [CH_3], 14.2 [CH_3], 13.0 [CH_3].

MS (ESI+) m/z 355 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

6-(4-(3-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl) pent-4-yn-1-yl)4-methylbenzenesulfonate (39**)**

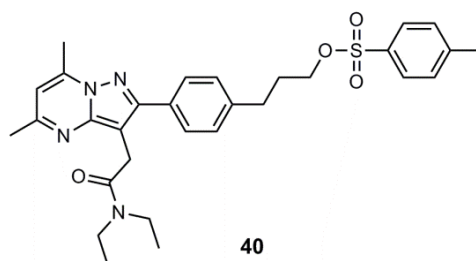
To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**15c**, 40 mg, 0.096 mmol) in dichloromethane (0.40 mL) were added (under argon) triethylamine (16 μ L, 0.115 mmol, 1.2 eq) and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine. The reaction flask was filled with argon (2 cycles) and cooled to 0 °C with an ice bath. Then, tosyl anhydride (34 mg, 0.104 mmol, 1.1 eq) was rapidly added to the reaction mixture which was stirred at 0 °C for 10 min then at r.t. for 5 h. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with water (50 mL) and few drops of 1 M aqueous hydrochloric acid were added to reach a pH of 2. The mixture was then extracted twice with ethyl acetate (2 x 20 mL). The organic layers were combined, washed with a saturated potassium carbonate aqueous solution (10 mL), water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 98.5/1.5 v/v) to afford pure 6-(4-(3-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl) phenyl) pent-4-yn-1-yl)4-methylbenzene sulfonate (**39**, 30 mg, 0.052 mmol) as a white solid (55 % yield). Note that for the radiochemistry part, HPLC conditions were developed (HPLC B, C, E and G).

R_f (dichloromethane/methanol 95/5 v/v): 0.45.

t_R : 21.5 min [HPLC B]; t_R : 15.5 min [HPLC C]; t_R : 3.51 min [HPLC E]; t_R : 15.5 min [HPLC G].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.80 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.76 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ph), 7.36 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.31 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.53 (s, 1H), 4.21 (t, 2H, J = 5.6 Hz, CH_2OTs), 3.94 (s, 2H, CH_2), 3.51 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 3.40 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.49 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH_2), 2.39 (s, 3H, CH_3), 1.94 (q^5 , 2H, J = 6.8 Hz, CH_2), 1.23 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.4 [C], 147.0 [C], 145.0 [C], 144.8 [C], 133.1 [C], 132.8 [C], 131.6 [2xCH], 129.8 [2xCH], 128.4 [2xCH], 127.8 [2xCH], 123.3 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 88.4 [C], 81.7 [C], 68.9 [CH_2], 42.2 [CH_2], 40.6 [CH_2], 28.0 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.3 [CH_3], 21.6 [CH_3], 16.8 [CH_3], 15.7 [CH_2], 14.3 [CH_3], 13.0 [CH_3].

3-(4-(3-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl) propyl-4-methylbenzenesulfonate (40)

To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-hydroxypropyl) phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**9**, 150 mg, 0.381 mmol) in dichloromethane (5 mL) were added tosyl chloride (87 mg, 0.457 mmol, 1.2 eq) and triethylamine (106 μ L, 0.761 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 16 h and quenched with a 1 M aqueous hydrochloric acid solution (20 mL). The product was extracted with ethyl acetate (20 mL) and the organic layer was washed with water (10 mL), brine (5 mL), dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 98/2 v/v) to afford 3-(4-(3-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl) propyl 4-methylbenzenesulfonate (**40**, 178 mg, 0.325 mmol) as a light yellow oil (85 % yield). Note that for the radiochemistry part, HPLC conditions were developed (HPLC D, F and H).

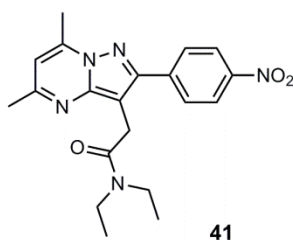
R_f (dichloromethane/methanol 92.5/7.5 v/v): 0.53.

t_R : 33 min [HPLC D]; t_R : 5.0 min [HPLC F]; t_R : > 45 min [HPLC H].

^1H -RMN (CD_2Cl_2) δ 7.80 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.69 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.40 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.19 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 6.58 (s, 1H), 4.05 (t, 2H, J = 6.4 Hz), 3.90 (s, 2H), 3.51 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 3.39 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.70 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.47 (s, 3H, CH_3), 2.00 (m, 2H, CH_2), 1.23 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH_2CH_3).

^{13}C -RMN (CD_2Cl_2) δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.3 [C], 147.6 [C], 145.0 [C], 144.8 [C], 140.7 [C], 133.0 [C], 131.8 [C], 129.8 [2xCH], 128.4 [2xCH], 128.4 [2xCH], 127.7 [2xCH], 108.2 [CH], 101.0 [C], 69.7 [CH_2], 42.1 [CH_2], 40.4 [CH_2], 31.1 [CH_2], 30.3 [CH_2], 27.9 [CH_2], 24.3 [CH_3], 21.3 [CH_3], 16.5 [CH_3], 14.0 [CH_3], 12.8 [CH_3].

MS (ESI+) m/z 549 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 571 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 587 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

2-(5,7-Dimethyl-2-(4-nitrophenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (41)

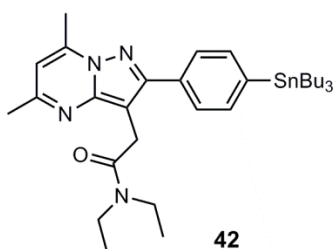
To a solution of 4-(3-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyltrifluoromethanesulfonate (**33**, 100 mg, 0.206 mmol) in *tert*-butanol (2 mL) were added sodium nitrite (28 mg, 0.406 mmol, 2.0 eq), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (5 mg, 2.6 mol %), 2-(di-*tert*-butylphosphino)-2',4',6'-triisopropyl-3,6-dimethoxy-1,1'-biphenyl (tBuBrettPhos, 5 mg, 0.010 mmol, 0.05 eq) and tris[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]amine (TDA, 3 mg, 0.009 mmol, 0.04 eq). The reaction mixture was flushed with argon and heated at 80 °C for 20 h. After cooling to r.t., the reaction was quenched with water (50 mL) and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (20 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was triturated in diethyl ether (4 mL) and filtered on a Büchner funnel to afford 2-(5,7-dimethyl-2-(4-nitrophenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**41**, 26 mg, 0.068 mmol) as a white solid (33 % yield).

R_f (diethyl ether/methanol: 97/3 v/v): 0.24.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.30 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ph), 8.12 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ph), 6.59 (s, 1H), 3.98 (s, 2H, CH₂), 3.58 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.40 (q, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.75 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 1.27 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.11 (t, 3H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 169.5 [C], 158.1 [C], 152.5 [C], 147.7 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 140.4 [C], 129.2 [2xCH], 123.6 [2xCH], 109.1 [CH], 102.1 [C], 42.3 [CH₂], 40.7 [CH₂], 27.8 [CH₂], 24.6 [CH₃], 16.7 [CH₃], 14.4 [CH₃], 13.0 [CH₃].

2-(5,7-Dimethyl-2-(4-(tributylstannyl)phenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (42)

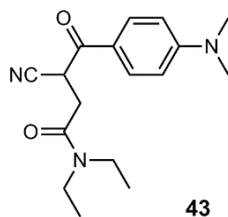


To a solution of *N,N*-diethyl-2-(2-(4-iodophenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**14**, 400 mg, 0.865 mmol) in toluene (20 mL) were added tetrakis(triphenylphosphine)palladium (100 mg, 0.0865 mmol, 10 mol %) and bis(tributyltin) (0.87 mL, 1.72 mmol, 2 eq). The flask was filled with argon and the reaction mixture was heated at 110 °C for 2 h. Then, the mixture was filtered on a silica pad to remove tin salts and the filtrate was concentrated to dryness (40 °C, 20 mbar). The residue was purified with flash chromatography on silica gel (toluene/acetone: 90/10 v/v) to afford 2-(5,7-dimethyl-2-(4-(tributylstannyl)phenyl) pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**42**, 200 mg, 0.320 mmol) as a colorless oil (37 % yield).

R_f (toluene/acetone: 80/20 v/v): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.75 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.54 (d, 2H, $J^3_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^4_{\text{Sn-H}} = 38$ Hz, Ph), 6.51 (s, 1H), 3.93 (s, 2H, CH_2), 3.49 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3), 1.59-1.51 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 1.38-1.29 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 1.20 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.08-1.04 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 0.89 (t, 9H, $J = 7.2$ Hz, $3 \times \text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.0 [C], 157.4 [C], 155.3 [C], 147.6 [C], 144.7 [C], 142.1 [C], 136.6 [s, $2 \times \text{CH}$, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^3_{\text{Sn-C}} = 31$ Hz], 133.2 [C], 127.9 [s, $2 \times \text{CH}$, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^2_{\text{Sn-C}} = 40$ Hz], 108.2 [CH], 101.1 [C], 42.2 [CH_2], 40.5 [CH_2], 29.0 [s, $3 \times \text{CH}_2$, $^{117/119}\text{Sn}$ satellites $J^3_{\text{Sn-C}} = 20$ Hz], 28.1 [CH_2], 27.3 [s, $3 \times \text{CH}_2$, Sn satellites $J^2_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 99 Hz ^{117}Sn 55 Hz], 24.7 [CH_3], 16.9 [CH_3], 14.3 [CH_3], 13.7 [$3 \times \text{CH}_3$], 13.1 [CH_3], 9.5 [s, $3 \times \text{CH}_2$, Sn satellites $J^1_{\text{Sn-C}} \text{ }^{119}\text{Sn}$ 337 Hz ^{117}Sn 323 Hz].

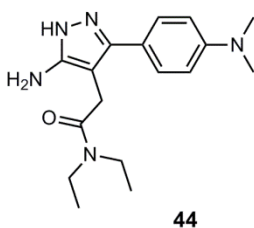
3-Cyano-4-(4-(dimethylamino)phenyl)-*N,N*-diethyl-4-oxobutanamide (43)

To a suspension of 3-[4-(dimethylamino)phenyl]-3-oxopropanenitrile (500 mg, 2.66 mmol) in ethanol (50 mL) was added in one portion under vigorous stirring sodium hydroxide (117 mg, 2.92 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred for 15 min. Then, sodium iodide (400 mg, 2.67 mmol, 1 eq) was added in one portion followed by *N,N*-diethylchloroacetamide (400 μ L, 2.91 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred for 48 h at r.t. After that period, the reaction mixture was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar) and the residue was partitioned between water (50 mL), which was acidified to pH 2 with 0.1 M aqueous hydrochloric acid, and ethyl acetate (100 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 x 50 mL) and brine (50 mL), dried over sodium sulphate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 99/1 v/v) to afford 3-cyano-4-(4-(dimethylamino)phenyl)-*N,N*-diethyl-4-oxobutanamide (**43**, 687 mg, 2.28 mmol) as a dark rose oil (86 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.42.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.94 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, Ph), 6.67 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, Ph), 4.98 (dd, 1H, $J = 8.8$ & 4.8 Hz, CH), 3.41-3.28 (m, 5H, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3 + \text{CHH}'$), 3.08 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 2.82 (dd, 1H, $J = 16.4$ & 4.8 Hz, CHH'), 1.26 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 186.6 [C], 167.4 [C], 154.1 [C], 131.3 [$2 \times \text{CH}$], 121.6 [C], 118.2 [C], 110.8 [$2 \times \text{CH}$], 41.9 [CH_2], 40.5 [CH_2], 40.0 [$2 \times \text{CH}_3$], 33.3 [CH], 32.4 [CH_2], 14.2 [CH_3], 12.9 [CH_3].

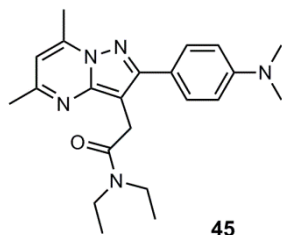
2-(5-Amino-3-(4-(dimethylamino)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N,N-diethylacetamide (44)

To a solution of 3-cyano-4-(4-(dimethylamino)phenyl)-N,N-diethyl-4-oxobutanamide (**43**, 687 mg, 2.28 mmol) in ethanol (20 mL) were cautiously added in one portion monohydrated hydrazine (335 μ L, 6.85 mmol, 3 eq) and glacial acetic acid (228 μ L, 3.98 mmol, 1.7 eq) at r.t. The reaction mixture was refluxed for 7 h and then, it was stirred at r.t. overnight. The day after, the mixture was concentrated to dryness (40 $^{\circ}$ C, 50 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (50 mL). The solution was washed with a saturated potassium carbonate aqueous solution (20 mL), water (2 x 15 mL), brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 150 mbar). The resulting bright yellow solid was triturated in cold diethyl ether (10 mL) and collected on a Büchner funnel. The solid was then washed with additional cold diethyl ether (2 x 5 mL) and suck-dried to afford 2-(5-amino-3-(4-(dimethylamino)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N,N-diethylacetamide (**44**, 305 mg, 0.967 mmol) as a beige powder (42 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 92/8 v/v): 0.22.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.26 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ph), 6.74 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ph), 3.51 (s, 2H, CH_2), 3.30 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.05 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.99 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1.06 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 0.91 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.4 [C], 155.0 [C], 150.4 [C], 142.5 [C], 128.6 [$2\times\text{CH}$], 117.9 [C], 112.3 [$2\times\text{CH}$], 97.1 [C], 42.3 [CH_2], 40.4 [CH_2], 40.3 [$2\times\text{CH}_3$], 28.7 [CH_2], 14.0 [CH_3], 13.0 [CH_3].

2-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethyl acetamide (45)

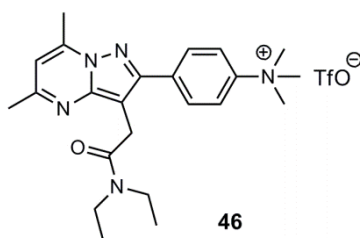
To a solution of 2-(5-amino-3-(4-(dimethylamino)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**44**, 150 mg, 0.476 mmol) in ethanol (20 mL) was added dropwise acetylacetone (147 μ L, 1.43 mmol, 3 eq). The reaction mixture was heated to 80 °C for 6 h and then, it was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar). The resulting solid was triturated in cold diethyl ether (5 mL) and filtered on a Büchner funnel. The precipitate was then washed with additional cold diethyl ether (2 x 2 mL) and suck-dried to afford 2-(2-(4-(dimethylamino)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethyl acetamide (**45**, 143 mg, 0.376 mmol) as shiny beige crystals (79 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 93/7 v/v): 0.47.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.73 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ph), 6.80 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ph), 6.46 (s, 1H), 3.92 (s, 2H, CH_2), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 3.42 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.99 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 2.73 (s, 3H, CH_3), 2.52 (s, 3H, CH_3), 1.19 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 1.12 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.2 [C], 157.1 [C], 155.4 [C], 150.4 [C], 147.7 [C], 144.5 [C], 129.4 [$2 \times \text{CH}$], 121.8 [C], 112.4 [$2 \times \text{CH}$], 107.7 [CH], 100.2 [C], 42.2 [CH_2], 40.6 [$2 \times \text{CH}_3$], 40.5 [CH_2], 28.3 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.9 [CH_3], 14.2 [CH_3], 13.0 [CH_3].

4-(3-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-*N,N,N*-trimethylbenzenaminium trifluoromethanesulfonate (46)

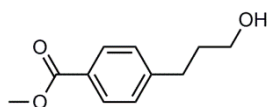


To a solution of 2-(2-(4-(dimethylamino) phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-diethylacetamide (**45**, 150 mg, 0.395 mmol) in toluene (3 mL) was added methyl trifluoromethanesulfonate (36 μ L, 0.318 mmol, 0.8 eq) in one portion at r.t. The reaction mixture was stirred for 15 min at r.t. Then, it was cooled to 0 °C and the resulting yellow suspension was filtered on a Büchner funnel. The precipitate was washed with diethylether (2 x 3 mL) and suck-dried under vacuum to afford pure 4-(3-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-*N,N,N*-trimethyl benzenaminium trifluoromethanesulfonate (**46**, 105 mg, 0.193 mmol) as a beige fine powder (49 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 98/2 v/v): no migration.

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4 , 400 MHz): δ 8.05 (m, 4H, Ph), 6.86 (s, 1H), 4.06 (s, 2H, CH_2), 3.75 (s, 9H, 3xNCH₃), 3.61 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 2.78 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NCH₂CH₃), 1.11 (t, 3H, 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD- d_4 , 100 MHz): δ 170.5 [C], 159.1 [C], 152.4 [C], 147.2 [C], 146.9 [C], 145.8 [C], 135.9 [C], 129.9 [2xCH], 120.3 [q, $J^1_{\text{CF}} = 317$ Hz, C], 119.9 [2xCH], 109.0 [CH], 101.0 [C], 56.2 [3xCH₃], 42.2 [CH₂], 40.6 [CH₂], 27.2 [CH₂], 22.3 [CH₃], 15.3 [CH₃], 12.9 [CH₃], 11.8 [CH₃].

Methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoate (47)**47**

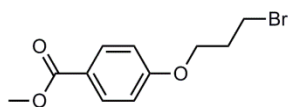
Method 1: Note that for safety reasons, this reaction was carried out on 3 different batches. To a solution of methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (**1**, 3 x 10.0 g, 158 mmol) in methanol (3 x 250 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal in one portion to each reaction mixture (3 x 400 mg, 0.376 mmol, 0.7 mol %). Then, each reaction flask was degassed under vacuum and filled with hydrogen at 1 atm (two 250-mL balloons per flask). The reaction mixtures were stirred at r.t. for 3 days and the balloons were refilled when necessary. Once completed (NMR-monitoring), the reaction mixtures were cautiously filtered on a pad of silica gel under argon pressure and the catalyst was washed with dichloromethane/methanol: 80/20 v/v (500 mL). The filtrates were combined, concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar) and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v) to afford methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoate (**47**, 20.1 g, 103 mmol) as an amber oil (65 %).

Method 2: To a solution of methyl 4-(3-bromopropoxy)benzoate (**48**, 1.0 g, 3.66 mmol) under argon in toluene (100 mL) was added with an addition funnel a solution of 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) (150 mg, 0.913 mmol, 0.2 eq) and tributyltin hydride (1.38 g, 4.76 mmol, 1.3 eq) in toluene (20 mL). The addition proceeded at r.t. over a period of 17 min. Then, the reaction mixture was refluxed at 110 °C for 6 h. Once completed (TLC monitoring), the reaction was concentrated (40 °C, 20 mbar) and the resulting oil was diluted in ethyl acetate (50 mL). The solution was washed with a 0.1 M aqueous hydrochloric acid solution (20 mL), water (2 x 20 mL), brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v) to afford methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoate (**47**, 114 mg, 0.586 mmol) as a colorless oil (16 %).

R_f (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v): 0.18.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.93 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.24 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂OH), 2.74 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH₂), 2.36 (s, 1H, OH), 1.88 (tt, 2H, J = 7.6 & 6.4 Hz, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 167.2 [C], 147.5 [C], 129.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 127.6 [C], 61.7 [CH₂], 51.9 [CH₃], 33.7 [CH₂], 32.0 [CH₂].

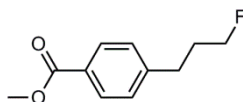
Methyl 4-(3-bromopropoxy)benzoate (48)**48**

To a suspension of potassium carbonate (18 g, 132 mmol, 2 eq) in acetone (400 mL) was added dropwise 1,3-dibromopropane (20 mL, 196 mmol, 3 eq). The reaction mixture was inerted with argon bubbling and a solution of methyl 4-hydroxybenzoate (10 g, 65.7 mmol) in acetone (100 mL) was added in one portion at r.t. The reaction mixture was heated at 60 °C overnight. Then, the suspension was filtered off on a Büchner funnel and the filtrate was concentrated to dryness (30 °C, 400 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene/dichloromethane: 100/0 to 90/10 v/v) to afford pure methyl 4-(3-bromopropoxy)benzoate (**48**, 13.9 g, 50.9 mmol) as shiny white crystals (77 % yield).

R_f (dichloromethane): 0.56.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.99 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ph), 6.92 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ph), 4.16 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂), 3.88 (s, 3H, CH₃), 3.61 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂), 2.34 (q⁵, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.7 [C], 162.3 [C], 131.5 [2xCH], 122.7 [C], 114.0 [2xCH], 65.4 [CH₂], 51.8 [CH₃], 32.1 [CH₂], 29.7 [CH₂].

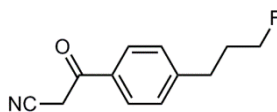
Methyl 4-(3-fluoropropyl)benzoate (49)**49**

To a solution of methyl 4-(3-hydroxypropyl)benzoate (**47**, 5.00 g, 25.7 mmol) in dichloromethane (200 mL) cooled at 0 °C was cautiously added dropwise a 50 % Deoxofluor® solution in toluene (20 mL, excess) over 15 min. The reaction mixture was warmed up to r.t. and stirred overnight. Then, it was cooled at 0 °C and water (100 mL) was slowly and cautiously added. The organic layer was separated and washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 500 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate: 90/10 to 50/50 v/v) to afford methyl 4-(3-fluoropropyl)benzoate (**49**, 3.55 g, 18.1 mmol) as a pale oil (70 % yield). Unreacted starting material (680 mg, 3.50 mmol) was recovered.

R_f (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v): 0.52.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.96 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.26 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 4.44 (dt, 2H, J²_{HF} = 47.2 Hz, J³_{HH} = 6.0 Hz, CH₂F), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 2.80 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH₂), 2.01 (dt, 2H, J³_{HF} = 27.2 Hz, J³_{HH} = 7.6 & 6.0 Hz, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.9 [C], 146.5 [C], 129.7 [2xCH], 128.4 [2xCH], 128.0 [C], 82.8 [d, J¹_{CF} = 164 Hz, CH₂], 51.9 [CH₃], 31.6 [d, J²_{CF} = 19 Hz, CH₂], 31.3 [d, J³_{CF} = 5 Hz, CH₂].

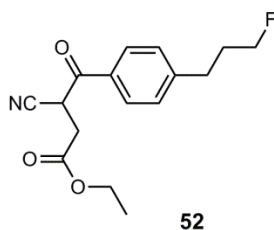
3-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (50)**50**

To an airtight flask under argon containing anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) cooled at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liquid nitrogen/acetone bath) was carefully channelled a 2.5 M *n*-butyllithium solution in hexanes (23 mL, 57.5 mmol, 3.0 eq). A solution of acetonitrile (3.0 mL, 57.8 mmol, 3.0 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) was cautiously added dropwise while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, a solution of methyl 4-(3-fluoropropyl)benzoate (**49**, 3.78 g, 19.3 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was carefully channelled to the mixture over 15 min while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. After the addition, the content was stirred for 30 min at $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with methanol (10 mL) at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, the reaction mixture was poured into water (400 mL) and the resulting solution was acidified with a 37 % aqueous hydrochloric acid solution to pH 3. The mixture was extracted by ethyl acetate (2 x 200 mL) and the combined organic layers were then washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/ethyl acetate: 70/30 to 60/40 v/v) to afford 3-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**50**, 3.33 g, 16.2 mmol) as white crystals (84 % yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 50/50 v/v): 0.37.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.86 (d, 2H, $J = 8.0\text{ Hz}$, Ph), 7.35 (d, 2H, $J = 8.0\text{ Hz}$, Ph), 4.46 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2\text{ Hz}$, $J^3_{\text{HH}} = 6.0\text{ Hz}$, CH_2F), 4.07 (s, 2H, CH_2), 2.84 (t, 2H, $J = 7.6\text{ Hz}$, CH_2), 2.04 (dtt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.6\text{ Hz}$, $J^3_{\text{HH}} = 7.6\text{ \& } 6.0\text{ Hz}$, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 186.6 [C], 148.9 [C], 132.3 [C], 129.2 [2xCH], 128.7 [2xCH], 113.8 [C], 82.7 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164\text{ Hz}$, CH_2], 31.5 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5\text{ Hz}$, CH_2], 31.4 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20\text{ Hz}$, CH_2], 29.3 [CH_2].

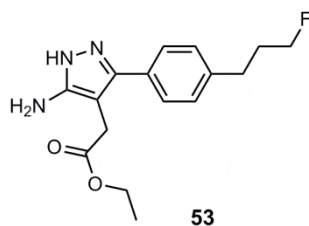
Ethyl 3-cyano-4-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-4-oxobutanoate (52)

To a solution of 3-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**50**, 7.52 g, 36.6 mmol) in ethanol (300 mL) was added in one portion under vigorous stirring sodium hydroxide (1.62 g, 40.5 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 15 min. Then, sodium iodide (5.50 g, 36.7 mmol, 1 eq) and ethyl bromoacetate (4.47 mL, 40.3 mmol, 1.1 eq) were added to the reaction mixture which was stirred at r.t. for a week. The reaction mixture was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar) and the residue was partitioned between water (100 mL), which was acidified to pH 1 with a 37 % aqueous hydrochloric acid solution, and ethyl acetate (200 mL). The organic layer was separated, washed with water (200 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/diethyl ether: 80/20 v/v) to afford ethyl 3-cyano-4-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-4-oxobutanoate (**52**, 5.19 g, 17.8 mmol) as a yellow oil (49 % yield).

R_f (heptane/diethyl ether: 40/60 v/v): 0.35.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.98 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.36 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 4.74 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 5.6 Hz, CH), 4.46 (dt, 2H, J²_{HF} = 47.2 Hz, J³_{HH} = 5.6 Hz, CH₂), 4.18 (q, 2H, J = 7.6 Hz, OCH₂CH₃), 3.26 (dd, 1H, J = 17.2 Hz, J = 8.4 Hz, CHH'), 2.92 (dd, 1H, J = 17.2 Hz, J = 5.6 Hz, CHH'), 2.84 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH₂), 2.04 (dt, 2H, J³_{HF} = 19.6 Hz, J³_{HH} = 7.6 & 5.6 Hz, CH₂), 1.26 (t, 3H, J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 188.0 [C], 169.5 [C], 148.9 [C], 131.8 [C], 129.3 [2xCH], 129.2 [2xCH], 116.4 [C], 82.6 [d, J¹_{CF} = 165 Hz, CH₂], 61.6 [CH₂], 34.1 [CH], 32.8 [CH₂], 31.5 [d, J³_{CF} = 5 Hz, CH₂], 31.4 [d, J²_{CF} = 20 Hz, CH₂], 14.0 [CH₃].

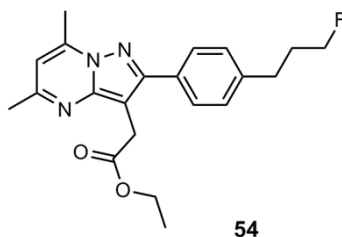
Ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetate (53)

To a solution of ethyl 3-cyano-4-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-4-oxobutanoate (**52**, 1.98 g, 6.80 mmol) in ethanol (40 mL) were added dropwise at r.t. monohydrated hydrazine (1 mL, 20.4 mmol, 3 eq) and glacial acetic acid (680 μ L, 11.9 mmol, 1.7 eq). The reaction mixture was refluxed for 2 h. Then, it was concentrated to dryness (40 $^{\circ}$ C, 50 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (50 mL) and a 10 % potassium carbonate aqueous solution (20 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 x 20 mL) and brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 97/3 v/v) to afford ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetate (**53**, 850 mg, 2.78 mmol) as an orange oil (41 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 92/8 v/v): 0.36.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.45 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.26 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.24 (b, 3H, $w_{1/2} = 88$ Hz, NH + NH_2), 4.46 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2), 4.17 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 3.41 (s, 2H, CH_2), 2.77 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.08-1.95 (m, 2H, CH_2), 1.27 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.9 [C], 153.8 [C], 143.0 [C], 141.7 [C], 129.0 [2xCH], 127.8 [2xCH], 127.7 [C], 96.8 [C], 82.9 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 61.1 [CH_2], 31.8 [d, $J^2_{\text{CF}} = 19$ Hz, CH_2], 31.0 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 29.4 [CH_2], 14.1 [CH_3].

Ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (54**)**

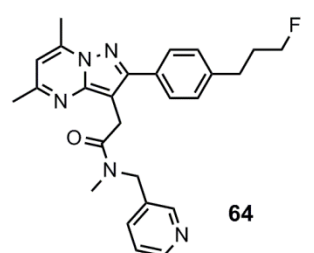
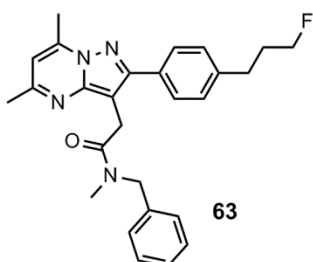
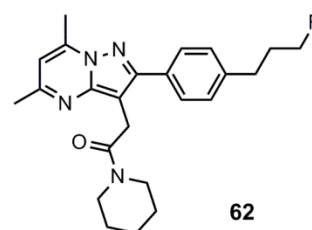
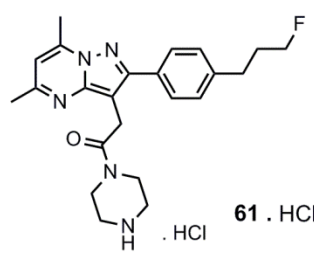
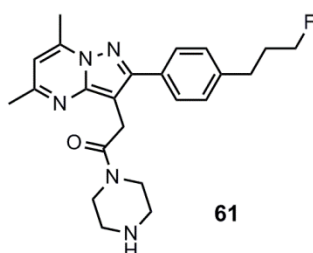
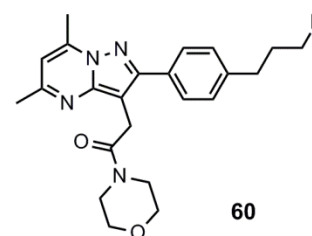
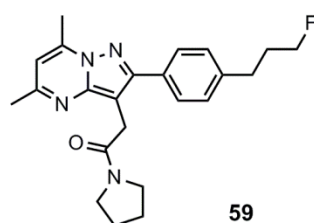
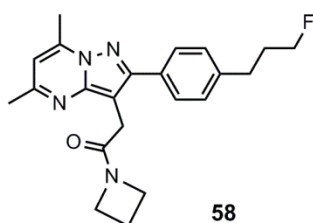
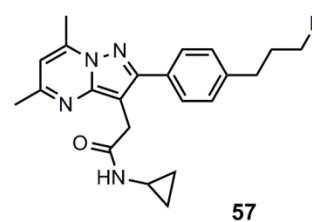
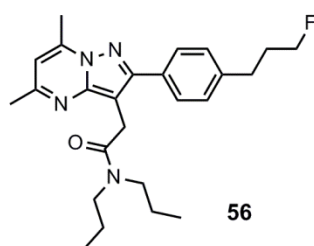
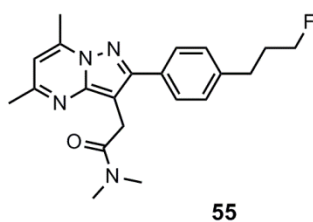
To a solution of ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)acetate (**53**, 748 mg, 2.44 mmol) in ethanol (50 mL) was added acetylacetone (0.50 mL, 4.87 mmol, 2.0 eq). The reaction mixture was refluxed for 5 h. Once the reaction completed (TLC-monitoring), the mixture was concentrated to dryness (40 °C, 50 mbar) and the residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL). The organic layer was washed with water (2 x 50 mL) and brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 98.5/1.5 v/v) to afford ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 773 mg, 2.09 mmol) as light yellow crystals (86 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 96/4 v/v): 0.60.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.70 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.30 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$ Hz, CH_2F), 4.13 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 3.97 (s, 2H, CH_2), 2.80 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, 2H, $J_{\text{HF}}^3 = 26.8$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 7.6$ & 6.0 Hz, CH_2), 1.19 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3).

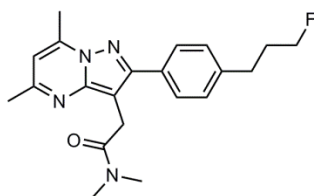
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.8 [C], 157.9 [C], 154.7 [C], 147.6 [C], 144.8 [C], 141.4 [C], 131.3 [C], 128.7 [2xCH], 128.4 [2xCH], 108.5 [CH], 99.4 [C], 83.0 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 164$ Hz, CH_2], 60.7 [CH_2], 31.9 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 20$ Hz, CH_2], 31.0 [d, $J_{\text{CF}}^3 = 5$ Hz, CH_2], 29.2 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.8 [CH_3], 14.1 [CH_3].

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dimethyl acetamide (55) ; 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (56) ; *N*-cyclopropyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (57) ; 1-(azetidin-1-yl)-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl) ethanone (58) ; 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(pyrrolidin-1-yl)ethanone (59) ; 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-morpholino ethanone (60) ; 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl) ethanone (61) ; 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone hydrochloride (61.HCl) ; 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperidin-1-yl) ethanone (62) ; *N*-benzyl-2-(2-(4-(3-fluoro propyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl acetamide (63) ; 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-(pyridin-3-yl methyl)acetamide (64)



General procedure for the amination: To a solution of the appropriate amine (4 eq) under argon in anhydrous toluene (3 mL) was added dropwise and at r.t. a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (3-4 eq). The reaction mixture was stirred at r.t. for 1 h and then, a solution of ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 1 eq) in toluene (1 mL) was added in one portion. The reaction mixture was heated to 70-110 °C or 70 °C for 30 min to 2 h. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was quenched with water (20 mL) and a 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution (10 mL) was added, unless otherwise stated. The mixture was extracted twice with ethyl acetate (2 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with water (20 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (40 °C, 40 mbar). The residue was either triturated in diethyl ether (2 mL) or purified by flash chromatography on silica gel to afford the desired product.

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dimethylacetamide (55**)**



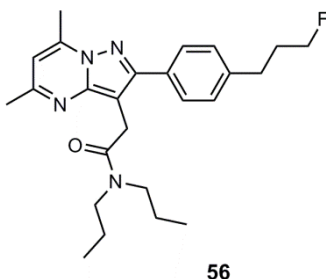
55

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dimethylacetamide (**55**) was prepared according to the previously described general procedure using dimethylamine hydrochloride (44 mg, 0.520 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (271 μ L, 0.542 mmol, 4 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 50 mg, 0.135 mmol). The mixture was heated at 110 °C for 30 min. The residue was triturated in diethyl ether (2 mL), filtered on a Büchner funnel and washed with cold diethyl ether (2 x 2 mL) to afford the desired product (**55**, 30 mg, 0.0814 mmol) as beige crystals (60 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 97/3 v/v): 0.20.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.75 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.29 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 3.94 (s, 2H, CH_2), 3.16 (s, 3H, NCH_3), 2.98 (s, 3H, NCH_3), 2.79 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dq⁵, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.8 [C], 157.5 [C], 155.1 [C], 147.4 [C], 144.9 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2xCH], 128.7 [2xCH], 108.3 [CH], 100.6 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 163$ Hz, CH_2], 37.6 [CH_3], 35.8 [CH_3], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 28.2 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.9 [CH_3].

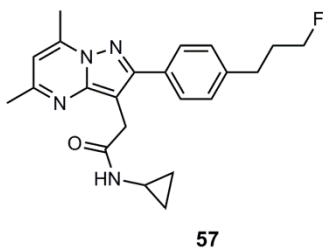
2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (56)

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (**56**) was prepared according to the previously described general procedure using dipropylamine (222 μ L, 1.62 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (810 μ L, 1.62 mmol, 4 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 150 mg, 0.406 mmol). The mixture was heated at 100 $^{\circ}$ C for 1 h. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 99/1 v/v) to afford the desired product (**56**, 105 mg, 0.247 mmol) as a yellow oil (61 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 97/3 v/v): 0.25.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.28 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2), 3.95 (s, 2H, CH_2), 3.38 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.31 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.80 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.6$ & 6.0 Hz, CH_2), 1.65 (sext, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.55 (sext, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.91 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.86 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.4 [C], 157.4 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [2xCH], 128.6 [2xCH], 108.2 [CH], 101.1 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 49.9 [CH_2], 48.0 [CH_2], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 19$ Hz, CH_2], 31.0 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 28.1 [CH_2], 24.5 [CH_3], 22.2 [CH_2], 20.8 [CH_2], 16.8 [CH_3], 11.3 [CH_3], 11.2 [CH_3].

***N*-Cyclopropyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**57**)**

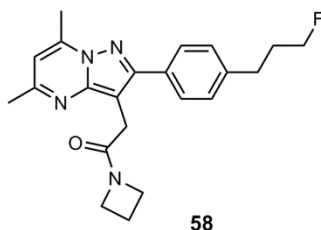
N-Cyclopropyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (**57**) was prepared according to the previously described general procedure using cyclopropylamine (38 μ L, 0.548 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (274 μ L, 0.548 mmol, 4 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 50 mg, 0.135 mmol). The mixture was heated at 110 °C for 45 min. The residue was triturated in iced diethylether (5 mL), filtered on a Büchner funnel and washed with iced diethyl ether (2 x 2 mL) to afford the desired product (**57**, 42 mg, 0.110 mmol) as a white solid (81 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.28.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.81 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.33 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.88 (b, 1H, $w_{1/2} = 21$ Hz, NH), 6.60 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 3.80 (s, 2H, CH_2), 2.81 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.79 (s, 3H, CH_3), 2.65 (m, 1H, CH), 2.60 (s, 3H, CH_3), 2.05 (dtt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.6$ & 6.0 Hz, CH_2), 0.68 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2), 0.33 (bt, $w_{1/2} = 21$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 172.6 [C], 158.1 [C], 155.0 [C], 147.2 [C], 145.5 [C], 141.8 [C], 130.4 [C], 128.9 [2xCH], 128.8 [2xCH], 108.5 [CH], 100.1 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.7 [CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 24.4 [CH], 22.5 [CH_3], 16.9 [CH_3], 6.3 [2x CH_2].

1-(Azetidin-1-yl)-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)ethanone (58)

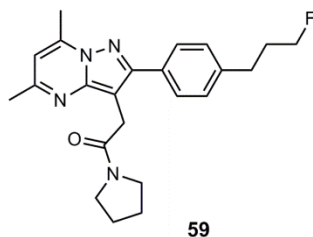


1-(Azetidin-1-yl)-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)ethanone (**58**) was prepared according to the previously described general procedure using azetidine (110 μ L, 1.63 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (609 μ L, 1.22 mmol, 3 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 150 mg, 0.406 mmol). The mixture was heated at 70 °C for 1 h. No acidic treatment was used for the work-up of this compound. The residue was triturated in cold diethyl ether (4 mL) and filtered on a Büchner funnel. The precipitate was further washed with cold diethyl ether (3 x 2 mL) and suck-dried under vacuum to afford the desired product (**58**, 75 mg, 0.197 mmol) as a beige crystalline powder (49 % yield). A higher purity was obtained after recrystallization in boiling diethyl ether containing few drops of ethanol.

R_f (dichloromethane/methanol: 96/4 v/v): 0.18.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.77 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.24 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.46 (s, 1H), 4.41 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 4.20 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 3.97 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 3.63 (s, 2H, CH_2), 2.73 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.67 (s, 3H, CH_3), 2.49 (s, 3H, CH_3), 2.17 (q⁵, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.6$ & 6.0 Hz, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.0 [C], 157.6 [C], 155.2 [C], 147.4 [C], 144.8 [C], 141.3 [C], 131.3 [C], 128.8 [2xCH], 128.7 [2xCH], 108.3 [CH], 100.0 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 50.7 [CH_2], 48.1 [CH_2], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 26.4 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.8 [CH_3], 15.1 [CH_2].

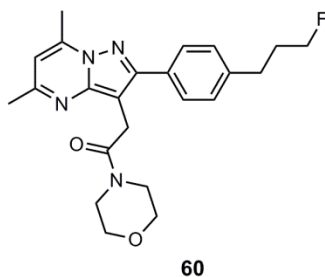
2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(pyrrolidin-1-yl)ethanone (59)

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(pyrrolidin-1-yl)ethanone (**59**) was prepared according to the previously described general procedure using pyrrolidine (136 μ L, 1.63 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (710 μ L, 1.42 mmol, 3.5 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 150 mg, 0.406 mmol). The mixture was heated at 110 $^{\circ}$ C for 1 h. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97.5/2.5 v/v) to afford the desired product (**59**, 107 mg, 0.271 mmol) as a shiny white foam (67 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.29.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.79 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.29 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 3.88 (s, 2H, CH_2), 3.65 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_2), 3.50 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_2), 2.79 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3), 2.03 (dt, $J^3_{\text{HF}} = 26.8$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.6$ & 6.0 Hz, CH_2), 1.99 (q⁵, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2), 1.86 (q⁵, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.4 [C], 157.5 [C], 155.2 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.8 [2xCH], 128.6 [2xCH], 108.2 [CH], 100.6 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 46.8 [CH_2], 45.9 [CH_2], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 19$ Hz, CH_2], 31.0 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 29.5 [CH_2], 26.2 [CH_2], 24.6 [CH_3], 24.4 [CH_2], 16.8 [CH_3].

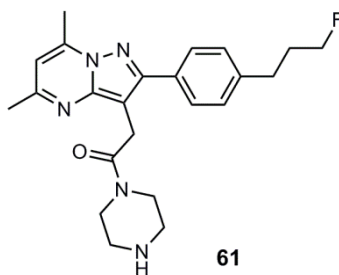
2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-morpholinoethanone (60)

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-morpholinoethanone (**60**) was prepared according to the previously described general procedure using morpholine (94 mg, 1.08 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (540 μ L, 1.08 mmol, 4 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 100 mg, 0.271 mmol). The mixture was heated at 100 °C for 1 h. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 99/1 to 97/3 v/v) to afford the desired product (**60**, 89 mg, 0.217 mmol) as a yellow solid (80 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.33.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.80 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.31 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 5.6$ Hz, CH_2F), 3.95 (s, 2H, CH_2), 3.75-3.60 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$), 2.80 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 2.76 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.2$ & 5.6 Hz, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.7 [C], 157.6 [C], 155.0 [C], 147.3 [C], 144.9 [C], 141.4 [C], 131.3 [C], 128.8 [$2\times\text{CH}$], 128.7 [$2\times\text{CH}$], 108.4 [CH], 100.2 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 66.9 [CH_2], 66.7 [CH_2], 46.4 [CH_2], 42.3 [CH_2], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 19$ Hz, CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 27.9 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.9 [CH_3].

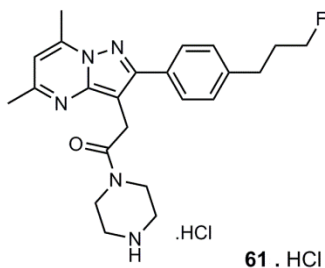
2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone (61)**61**

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone (**61**) was prepared according to the previously described general procedure using piperazine (140 mg, 1.63 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (710 μ L, 1.42 mmol, 3.5 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 150 mg, 0.406 mmol). The mixture was heated at 110 °C for 1 h. A basic treatment was used as work up. The reaction mixture was quenched with a 1 M sodium bicarbonate aqueous solution (10 mL) and the resulting inorganic precipitate was filtered off on a Büchner funnel. The filtrate was extracted as described in the general procedure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 97/3 to 94/6 v/v) to afford the desired product (**61**, 141 mg, 0.344 mmol) as a waxy pale yellow solid (85 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 80/20 v/v): 0.36.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.78 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 7.30 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 6.53 (s, 1H), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 3.94 (s, 2H, CH_2), 3.66 (t, 2H, $J = 4.8$ Hz, CH_2), 3.62 (t, 2H, $J = 4.8$ Hz, CH_2), 2.85-2.82 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.80 (bt, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, $J^3_{\text{HF}} = 27.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.6$ & 6.0 Hz, CH_2), 1.96 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.5 [C], 157.7 [C], 155.0 [C], 147.3 [C], 144.9 [C], 141.4 [C], 131.2 [C], 128.8 [$2 \times \text{CH}$], 128.7 [$2 \times \text{CH}$], 108.4 [CH], 100.2 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 46.3 [CH_2], 45.7 [CH_2], 45.3 [CH_2], 42.2 [CH_2], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.0 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 28.0 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.8 [CH_3].

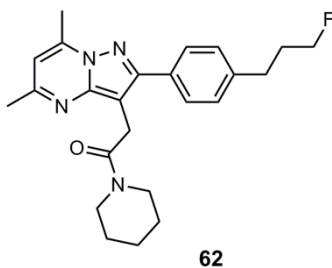
2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone hydrochloride (61.HCl)

To a solution of 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone (**61**, 28 mg, 0.068 mmol) in dichloromethane (0.50 mL) was added a few drops of a 1.25 M aqueous hydrochloric acid solution in methanol. The resulting precipitate was filtered on a Büchner funnel, washed with iced diethyl ether (4 x 2 mL) and suck-dried to afford 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-1-(piperazin-1-yl)ethanone hydrochloride (**61.HCl**, 14 mg, 0.031 mmol) as a bright yellow crystalline powder (46 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 98/2 v/v): no migration.

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4 , 400 MHz): δ 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.40 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.15 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.6$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 4.20 (s, 2H, CH_2), 3.99 (bt, 2H, $w_{1/2} = 16$ Hz, CH_2), 3.89 (bt, 2H, $w_{1/2} = 16$ Hz, CH_2), 3.41 (bt, 2H, $w_{1/2} = 16$ Hz, CH_2), 3.31 (m, 2H, CH_2), 2.96 (s, 3H, CH_3), 2.85-2.80 (m, 5H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 24.8$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.2$ & 6.0 Hz, CH_2).

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperidin-1-yl)ethanone (62)

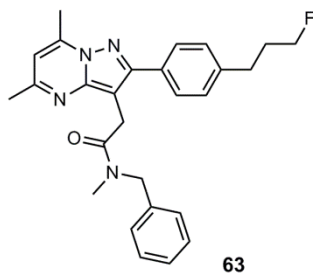


2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-1-(piperidin-1-yl)ethanone (**62**) was prepared according to the previously described general procedure using piperidine (160 μ L, 1.62 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (710 μ L, 1.42 mmol, 3.5 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 150 mg, 0.406 mmol). The mixture was heated at 110 $^{\circ}$ C for 2 h. The residue was triturated in cold diethyl ether (5 mL) and filtered on a Büchner funnel. The precipitate was further washed with cold diethyl ether (2 x 5 mL) and suck-dried under vacuum to afford the desired product (**62**, 101 mg, 0.247 mmol) as a crystalline beige powder (61 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 96/4 v/v): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.29 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 6.52 (s, 1H), 4.47 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 3.95 (s, 2H, CH_2), 3.57 (bs, 4H, $w_{1/2} = 18$ Hz, $2 \times \text{CH}_2$), 2.79 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.03 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.6$ & 6.0 Hz, CH_2), 1.64-1.63 (m, 2H, $w_{1/2} = 18$ Hz, CH_2), 1.53-1.52 (m, 4H, $w_{1/2} = 18$ Hz, $2 \times \text{CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 169.1 [C], 157.5 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 131.5 [C], 128.7 [$2 \times \text{CH}$], 128.6 [$2 \times \text{CH}$], 108.3 [CH], 100.8 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 46.9 [CH_2], 43.1 [CH_2], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.0 [d, $J^3_{\text{CF}} = 6.0$ Hz, CH_2], 28.1 [CH_2], 26.4 [CH_2], 25.6 [CH_2], 24.6 [CH_3], 24.5 [CH_2], 16.9 [CH_3].

***N*-Benzyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (63)**

N-Benzyl-2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methylacetamide (**63**) was prepared according to the previously described general procedure using *N*-benzylmethylamine (210 μ L, 1.63 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (710 μ L, 1.42 mmol, 3.5 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 150 mg, 0.406 mmol). The mixture was heated at 110 $^{\circ}$ C for 1 h. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 99/1 v/v) to afford the desired product (**63**, 112 mg, 0.251 mmol) as an orange gum (62 % yield). A higher purity was obtained after trituration in cold diethyl ether (3 mL) and filtration on a Büchner funnel.

R_f (dichloromethane/methanol: 98/2 v/v): 0.25.

Rotamer A (55 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, Ph), 7.33-7.10 (m, 7H, Ph), 6.54 (s, 1H), 4.63 (s, 2H, CH_2), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 4.01 (s, 2H, CH_2), 3.06 (s, 3H, CH_3), 2.81 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 2.76 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.6$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.2$ & 6.0 Hz, CH_2).

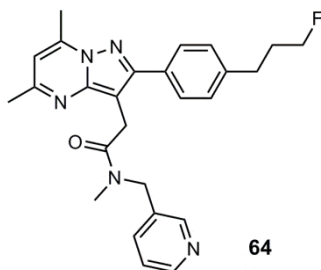
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.0 [C], 157.5 [C], 155.1 [C], 147.3 [C], 144.9 [C], 141.2 [C], 137.5 [C], 131.5 [C], 128.7 [2xCH], 128.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 128.0 [2xCH], 127.1 [CH], 108.3 [CH], 100.7 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 51.2 [CH_2], 35.2 [CH_3], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 6$ Hz, CH_2], 28.4 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.9 [CH_3].

Rotamer B (45 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.78 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, Ph), 7.33-7.10 (m, 7H, Ph), 6.49 (s, 1H), 4.73 (s, 2H, CH_2), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 4.04 (s, 2H, CH_2), 2.96 (s, 3H, CH_3), 2.81 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 2.70 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.6$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.2$ & 6.0 Hz, CH_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.4 [C], 157.6 [C], 155.0 [C], 147.5 [C], 144.8 [C], 141.2 [C], 137.7 [C], 131.4 [C], 128.7 [2xCH], 128.6 [2xCH], 128.5 [2xCH], 127.2 [CH], 126.1 [2xCH], 108.2 [CH], 100.4 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 53.5 [CH_2], 34.3 [CH_3], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 6$ Hz, CH_2], 28.4 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.8 [CH_3].

2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)acetamide (64)



2-(2-(4-(3-Fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)-*N*-methyl-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)acetamide (**64**) was prepared according to the previously described general procedure using 3-[(methylamino)methyl]pyridine (198 μ L, 1.62 mmol, 4 eq), a 2 M trimethylaluminium solution in toluene (710 μ L, 1.42 mmol, 3.5 eq) and ethyl 2-(2-(4-(3-fluoropropyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (**54**, 150 mg, 0.406 mmol). The mixture was heated at 110 °C for 1 h and no acidic treatment was used. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 98/2 to 97/3 v/v) to afford the desired product (**64**, 141 mg, 0.316 mmol) as a yellow gum (78 % yield). A higher purity was obtained after trituration in cold diethyl ether (3 mL) and filtration on a Büchner funnel.

R_f (dichloromethane/methanol: 94/4 v/v): 0.20.

Rotamer A (70 %)

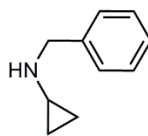
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.55-8.48 (m, 2H, Py), 7.73 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.57 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Py), 7.28 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.23-7.18 (m, 1H, Py), 6.54 (s, 1H), 4.62 (s, 2H, CH_2), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 4.01 (s, 2H, CH_2), 3.10 (s, 3H, CH_3), 2.80 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 2.75 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.6$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.2$ & 6.0 Hz, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.3 [C], 157.7 [C], 155.0 [C], 149.2 [CH], 148.7 [CH], 147.5 [C], 144.9 [C], 141.3 [C], 135.9 [CH], 133.1 [C], 131.4 [C], 128.7 [2xCH], 128.7 [2xCH], 123.5 [CH], 108.4 [CH], 100.3 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 48.9 [CH₂], 35.4 [CH₃], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 28.4 [CH₂], 24.6 [CH₃], 16.8 [CH₃].

Rotamer B (30 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.48 (m, 1H, Py), 8.37 (s, 1H, Py), 7.80 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.41 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Py), 7.31 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ph), 7.23-7.18 (m, 1H, Py), 6.49 (s, 1H), 4.75 (s, 2H, CH_2), 4.48 (dt, 2H, $J^2_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2F), 4.05 (s, 2H, CH_2), 2.93 (s, 3H, CH_3), 2.80 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 2.68 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3), 2.04 (dt, 2H, $J^3_{\text{HF}} = 25.2$ Hz, $J^3_{\text{HH}} = 7.2$ & 6.0 Hz, CH_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.4 [C], 157.7 [C], 154.9 [C], 148.6 [CH], 148.0 [CH], 147.0 [C], 144.8 [C], 141.4 [C], 133.6 [CH], 132.3 [C], 131.1 [C], 128.7 [2xCH], 128.7 [2xCH], 123.3 [CH], 108.3 [CH], 100.0 [C], 83.0 [d, $J^1_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 51.2 [CH_2], 34.2 [CH_3], 31.9 [d, $J^2_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 31.1 [d, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 28.7 [CH_2], 24.6 [CH_3], 16.7 [CH_3].

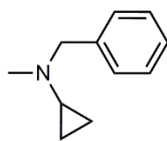
***N*-Benzylcyclopropanamine (65)****65**

To a solution of cyclopropylamine (3.0 g, 52.5 mmol) in tetrahydrofuran (120 mL) was added triethylamine (11 mL, 78.7 mmol, 1.5 eq) at r.t. Benzyl bromide (7.5 mL, 63.0 mmol, 1.2 eq) was then carefully added dropwise to the reaction mixture which was stirred overnight at r.t. The day after, a white suspension (ammonium salt) was observed. This solid was filtered off on a Büchner funnel and the filtrate was diluted with a 1 M sodium bicarbonate aqueous solution (400 mL). The mixture was then extracted twice with ethyl acetate (2 x 200 mL). The organic layers were combined, washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 98/2 v/v) to afford *N*-benzylcyclopropanamine (**65**, 3.25 g, 22.1 mmol) as a light yellow oil (42 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 96/4 v/v): 0.36.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.33 (m, 4H, Ph), 7.29-7.24 (m, 1H, Ph), 3.86 (s, 2H, CH_2), 2.17 (m, 1H, CH), 1.91 (s, 1H, NH), 0.48-0.44 (m, 2H, CH_2), 0.43-0.39 (m, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 140.5 [C], 128.4 [2xCH], 128.2 [2xCH], 126.8 [CH], 53.7 [CH_2], 30.0 [CH], 6.4 [2x CH_2].

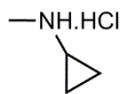
***N*-Benzyl-*N*-methylocyclopropanamine (66)****66**

To a cooled at 0 °C solution of *N*-benzylcyclopropanamine (**65**, 2.0 g, 13.6 mmol) in methanol (40 mL) was added a 37 % wt. aqueous formaldehyde solution (1.60 mL, 20.4 mmol, 1.5 eq). Sodium borohydride (770 mg, 20.4 mmol, 1.5 eq) was cautiously added to the mixture (exothermic reaction) which was then stirred for 20 min at 0 °C and overnight at r.t. Once completed (TLC analysis), the reaction was quenched with a saturated potassium carbonate aqueous solution (100 mL). The mixture was then extracted twice with ethyl acetate (2 x 50 mL). The organic layers were combined, washed twice with water (2 x 25 mL) and brine (25 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 99/1 v/v) to afford *N*-benzyl-*N*-methylocyclopropanamine (**66**, 0.845 g, 5.24 mmol) as a colorless oil (39 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 95/5 v/v): 0.41.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.32-7.24 (m, 5H, Ph), 3.68 (s, 2H, CH₂), 2.27 (s, 3H, CH₃), 1.73-1.70 (m, 1H, CH), 0.49-0.45 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 138.4 [C], 129.3 [2xCH], 128.0 [2xCH], 126.8 [CH], 62.2 [CH₂], 41.9 [CH], 38.4 [CH₃], 7.1 [2xCH₂].

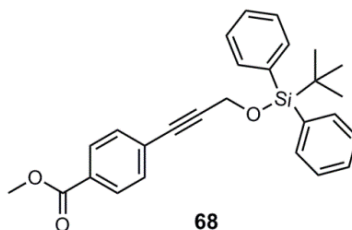
***N*-Methylcyclopropanamine hydrochloride (67)****67**

To a solution of *N*-benzyl-*N*-methylcyclopropanamine (**66**, 417 mg, 2.59 mmol) in methanol (10 mL) was cautiously added 10 % palladium on charcoal (26 mg, 1 mol%). The reaction vessel was degassed under reduced pressure and filled with hydrogen at 1 atm (two cycles). The reaction mixture was stirred at r.t. over the week-end. After that period, the catalyst was filtered off on a silica pad and washed with dichloromethane/methanol 80/20 (200 mL). Half of the filtrate was concentrated and then, a methanolic 1.25 M hydrochloric acid solution (14.5 mL, 18.1 mmol, 7 eq) was added. The filtrate was further concentrated to dryness (40 °C, 200 mbar) and the residue was let under high vacuum for 30 min. The product was then redissolved in dichloromethane (30 mL) and the solution dried over anhydrous sodium sulfate overnight to remove traces of moisture. The solution was filtered and concentrated to dryness to afford *N*-methylcyclopropanamine hydrochloride (**67**, 177 mg, 1.64 mmol) as a white hygroscopic solid stored under argon (63 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 90/10 v/v): no migration.

¹H-NMR (MeOD-*d*₄, 400 MHz): δ 2.77 (s, 4H, CH₃ + CH), 0.91-0.89 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C-NMR (MeOD-*d*₄, 100 MHz): δ 32.5 [CH₃], 31.2 [CH], 2.6 [2xCH₂].

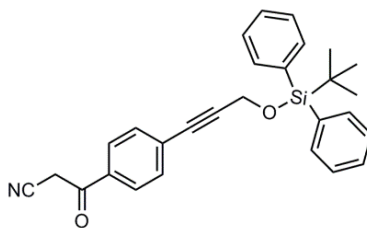
Methyl 4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)benzoate (68)

To a solution cooled at 0 °C of methyl 4-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (**1**, 29.7 g, 156 mmol) in anhydrous pyridine (500 mL) was added dropwise *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (30 mL, 115 mmol, 0.7 eq) over 15 min and the reaction mixture was stirred at r.t. for 12 h. It was then concentrated to dryness and the residue was diluted with water (500 mL). After acidification with 37 % aqueous hydrochloric acid (50 mL), the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 x 300 mL) and the combined organic layers were washed with water (2 x 400 mL) and brine (200 mL), dried over sodium sulphate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was finally purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol: 100/0 to 96/4 v/v) to afford methyl 4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)benzoate (**68**, 39.3 g, 91.7 mmol) as a beige solid. Unreacted starting material (7.60 g, 39.9 mmol) was also recovered (79 % corrected yield).

R_f (heptane/ethyl acetate: 70/30 v/v): 0.60.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.97 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.77 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.76 (d, 2H, J = 7.6 Hz, Ph), 7.47-7.37 (m, 8H, Ph), 4.57 (s, 2H, CH₂), 3.93 (s, 3H, CH₃), 1.10 (s, 9H, 3xCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 166.5 [C], 135.6 [4xCH], 133.0 [2xC], 131.4 [2xCH], 129.8 [2xCH], 129.4 [C], 129.3 [2xCH], 127.7 [4xCH], 127.6 [C], 90.7 [C], 84.4 [C], 53.1 [CH₂], 52.1 [CH₃], 26.7 [3xCH₃], 19.1 [C].

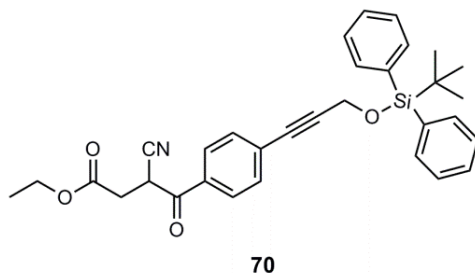
3-(4-(3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (69)**69**

To an airtight flask under argon containing anhydrous tetrahydrofuran (150 mL) cooled at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liquid nitrogen/acetone bath) was carefully channelled a 2.5 M *n*-butyllithium solution in hexanes (56 mL, 140 mmol, 3 eq). A solution of acetonitrile (7.26 mL, 140 mmol, 3 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was cautiously added dropwise while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, a solution of 4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl) benzoate (**68**, 20.0 g, 46.7 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (150 mL) was carefully channelled to the mixture over 25 min while maintaining the temperature below $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. After the addition, the content was stirred for 1 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then for 2 h at $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Once completed (TLC-monitoring), the reaction was rapidly quenched with methanol (20 mL). Then, the reaction mixture was poured into water (700 mL) which was acidified with a 37 % aqueous hydrochloric acid solution to pH 3. The mixture was then extracted with ethyl acetate (3 x 300 mL) and the combined organic layers were washed with water (2 x 200 mL) and brine (200 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 mbar). The residue was triturated in petroleum ether, filtered on a Büchner funnel, washed with iced petroleum ether (2 x 20 mL) and suck dried under vacuum to afford 3-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxopropanenitrile (**69**, 16.3 g, 37.2 mmol) as a beige powder (80 % yield).

R_f (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30 v/v): 0.26.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.84 (d, 2H, $J = 8.4\text{ Hz}$, Ph), 7.75 (d, 2H, $J = 8.0\text{ Hz}$, Ph), 7.75 (d, 2H, $J = 7.6\text{ Hz}$, Ph), 7.45-7.38 (m, 8H, Ph), 4.57 (s, 2H, CH_2), 4.06 (s, 2H, CH_2), 1.09 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 186.2 [C], 135.6 [$4\times\text{CH}$], 133.2 [C], 132.9 [$2\times\text{C}$], 132.0 [$2\times\text{CH}$], 129.8 [$2\times\text{CH}$], 129.6 [C], 128.2 [$2\times\text{CH}$], 127.7 [$4\times\text{CH}$], 113.5 [C], 92.6 [C], 83.9 [C], 53.0 [CH_2], 29.3 [CH_2], 26.6 [$3\times\text{CH}_3$], 19.1 [C].

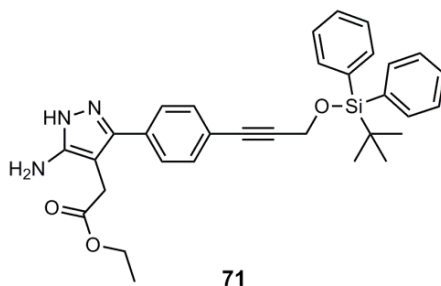
Ethyl 4-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-cyano-4-oxobutanoate (70)

To a solution of 3-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-oxo propanenitrile (**69**, 600 mg, 1.37 mmol) in ethanol (50 mL) was added in one portion and under vigorous stirring sodium hydroxide (60 mg, 1.50 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred for 10 min at r.t. and then, sodium iodide (411 mg, 2.74 mmol, 2 eq) and ethyl bromoacetate (151 μ L, 1.36 mmol, 1 eq) were added. The mixture was stirred at r.t. for 24 h and then concentrated to dryness (40 $^{\circ}$ C, 80 mbar). The residue was partitioned between water (100 mL) acidified to pH 1 with a 37 % aqueous hydrochloric acid solution and ethyl acetate (100 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 x 50 mL) and brine (25 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 $^{\circ}$ C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/diethylether: 80/20 to 60/40 v/v) to afford ethyl 4-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-cyano-4-oxobutanoate (**70**, 451 mg, 0.861 mmol) as a light yellow oil (63 % yield).

R_f (heptane/diethyl ether: 50/50 v/v): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.96 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ph), 7.75 (m, 4H, Ph), 7.47-7.38 (m, 8H, Ph), 4.72 (dd, 1H, $J = 8.4$ & 5.6 Hz, CH), 4.58 (s, 2H, CH_2), 4.19 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 3.27 (dd, 1H, $J = 17.2$ & 8.4 Hz, CHH'), 2.94 (dd, 1H, $J = 17.2$ & 5.6 Hz, CHH'), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 1.10 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 187.8 [C], 169.4 [C], 135.6 [$4\times\text{CH}$], 132.9 [$2\times\text{C}$], 132.8 [C], 132.0 [$2\times\text{CH}$], 129.8 [$2\times\text{CH}$], 129.6 [C], 128.7 [$2\times\text{CH}$], 127.7 [$4\times\text{CH}$], 116.1 [C], 92.5 [C], 84.0 [C], 61.7 [CH_2], 53.0 [CH_2], 34.2 [CH], 32.9 [CH_2], 26.6 [$3\times\text{CH}_3$], 19.1 [C], 14.0 [CH_3].

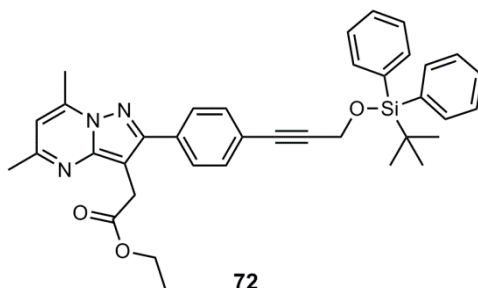
Ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl) acetate (71)

To a solution of ethyl 4-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-3-cyano-4-oxobutanoate (**70**, 13.9 g, 26.5 mmol) in ethanol (250 mL) was added dropwise at r.t. monohydrated hydrazine (4.0 mL, 82.5 mmol, 3.1 eq) and glacial acetic acid (0.20 mL, 3.49 mmol, 0.1 eq). The reaction mixture was refluxed for 3 h. Then, it was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar) and the residue was partitioned between ethyl acetate (200 mL) and a saturated potassium carbonate aqueous solution (100 mL). A white precipitate, which was not the product (NMR-analysis), was filtered off on a Büchner funnel. The filtrate was separated and the organic layer was washed with water (2 x 100 mL) and brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness (30 °C, 150 mbar). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (ethyl acetate) to afford ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl) acetate (**71**, 3.18 g, 5.91 mmol) as a golden foam (22 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 94/6 v/v): 0.28.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz, Ph), 7.46-7.36 (m, 12H, Ph), 4.56 (s, 2H, CH_2), 4.19 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 3.43 (s, 2H, CH_2), 1.29 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 1.10 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.7 [C], 153.7 [C], 142.7 [C], 135.6 [4xCH], 133.1 [2xC], 132.1 [2xCH], 131.8 [C], 129.7 [2xCH], 127.7 [4xCH], 127.3 [2xCH], 123.2 [C], 96.7 [C], 89.0 [C], 84.5 [C], 61.2 [CH_2], 53.1 [CH_2], 29.5 [CH_2], 26.7 [$3 \times \text{CH}_3$], 19.2 [C], 14.1 [CH_3].

Ethyl 2-(2-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo [1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (72)

To a solution of ethyl 2-(5-amino-3-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)acetate (**71**, 3.18 g, 5.91 mmol) in ethanol (100 mL) was added dropwise acetylacetone (1.87 mL, 18.2 mmol, 3.1 eq) at r.t. The reaction mixture was refluxed for 2 h and then, it was concentrated to dryness (40 °C, 80 mbar). The residue was triturated with iced diethyl ether (20 mL) and the resulting solid was filtered on a Büchner funnel, washed with iced diethyl ether (2 x 10 mL) and suck-dried under vacuum to afford ethyl 2-(2-(4-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)prop-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethyl pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetate (**72**, 2.33 g, 3.87 mmol) as a beige solid (65 % yield).

R_f (dichloromethane/methanol: 97/3 v/v): 0.75.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.78 (d, 4H, J = 6.4 Hz, Ph), 7.73 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph), 7.47-7.39 (m, 8H, Ph), 6.57 (s, 1H), 4.58 (s, 2H, CH₂), 4.14 (q, 2H, J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.98 (s, 2H, CH₂), 2.76 (s, 3H, CH₃), 2.57 (s, 3H, CH₃), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.11 (s, 9H, 3xCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 171.6 [C], 158.1 [C], 153.9 [C], 147.8 [C], 144.8 [C], 135.6 [4xCH], 133.4 [C], 133.1 [2xC], 131.8 [2xCH], 129.7 [2xCH], 128.0 [2xCH], 127.6 [4xCH], 122.9 [C], 108.8 [CH], 99.7 [C], 88.5 [C], 85.0 [C], 60.8 [CH₂], 53.2 [CH₂], 29.2 [CH₂], 26.7 [3xCH₃], 24.6 [CH₃], 19.2 [C], 16.8 [CH₃], 14.1 [CH₃].

Chapter 2: Radiochemistry

1. General information

1.1. HPLC systems and conditions

[HPLC G]: TRACERLab FX N Pro (GE Medical Systems, Germany) integrated system, equipped with a Sykam S1122 Solvent Delivery System (pump), a Knauer K-2501 UV-multiwavelength detector and a miniaturized gamma-radioactivity detector. Column: semipreparative SymmetryPrep[®] C-18, Waters (300 x 7.8 mm) ; porosity 7 μ m ; conditions: CH₃CN / H₂O / TFA: 60 / 40 / 0.1 (v/v/v) ; 5 mL/min at r.t. ; UV detection at 254 nm.

[HPLC H]: TRACERLab FX FN (GE Medical Systems, Germany) integrated system, equipped with a Sykam S1122 Solvent Delivery System (pump), a Knauer K-2501 UV-multiwavelength detector and a miniaturized gamma-radioactivity detector and a miniaturize gamma-radioactivity detector. Column: X-Terra[®] RP18, Waters (300 x 7.8 mm) ; porosity 7 μ m ; conditions: CH₃CN / aq. 0.1 M NH₄OAc (pH 10) : 40 / 60 (v/v) ; 4 mL/min at r.t. ; UV detection at 254 nm.

[HPLC E]: Waters Alliance 2690 (or a Waters binary HPLC Pump 1525) equipped with a UV spectrophotometer (Photodiode Array Detector, Waters 996) and a Berthold LB509 radioactivity detector ; column: analytical Symmetry-M[®] C-18, Waters (50 x 4.6 mm) ; porosity 3.5 μ m ; conditions: solvA/solvB: 20/80 (v/v) [solvA: H₂O containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL ; solvB: H₂O/CH₃CN: 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL] ; 2.0 mL/min at r.t. ; UV detection at 280 nm.

[HPLC F]: Waters Alliance 2965 system equipped with a Waters 2996 Photodiode Array Detector and a Berthold LB509 radioactivity detector ; column: analytical Symmetry[®] C-18, Waters (50 x 4.6 mm) ; porosity 3.5 μ m ; conditions: [solvA: H₂O containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL ; solvB: H₂O/CH₃CN: 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL] ; 2 mL/min at r.t. ; UV detection at 259 nm.

1.2. Radioisotope production

No-carrier-added fluorine-18 (half-life: 109.8 min) was produced *via* the [¹⁸O(p,n)¹⁸F] nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [¹⁸O]water (> 97 %-enriched, Rotem, CortecNet, France) target on an IBA Cyclone-18/9 (IBA, Louvain-la-Neuve, Belgium) cyclotron (18 MeV proton beam) and the aqueous radioactive solution was then transferred to the appropriate hot cell. Target hardware: commercial, 2-mL, two-port, stainless steel target holder equipped with a domed-end niobium cylinder insert. Target to hot cell liquid-transfer system: 50 m PTFE line (0.8 mm internal diameter ; 1/16 inch external diameter), 2.0 bar helium drive pressure, transfer time 2-3 min. Typical production of [¹⁸F]fluoride at the end of bombardment for a 25 μ A, 30 min (12.5 μ A.h) irradiation: 850-880 mCi (31.5-32.5 GBq).

2. Production of the radiotracers

2.1. Description of the radiosynthetizers

2.1.1. The TRACERLab FX N Pro

The scheme of the radiosynthetizer TRACERLab FX N Pro is given in the next page as **Figure 38**.

2.1.1.1. Radiosynthetizer description and sequences used

Fluorine-18-labeling, HPLC purification and formulation of [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) as an *i.v.* injectable solution were performed using a commercially available TRACERLab FX N Pro synthesizer (GE Medical Systems, Germany) placed in a 5.0-cm-lead shielded and ventilated cell. The whole process was thus fully automatized and used a dedicated method supported by three generic “time list”, written according to the programming mode of General Electric synthesis modules, and named respectively “Time list 1: K[^{18}F]F-K_{2.2.2} preparation”, “Time list 2: radiofluorination and pre-purification” and “Time list 3: purification and formulation”. Before each [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) batch production, the synthesizer was cleaned out (e.g. used-cartridge removal), purged from any residual chemicals or solvents left-over (reservoirs, reactors and tubings) from a previous radiotracer production and dried using another in-house programmed method, based on the use of two generic “time list”, named respectively “Time list: clean” and “Time list: clean and dry”. The first cleaning procedure used deionized water to rinse both reactors [**Reactor 1-2**], the flask collecting the oxygen-18-enriched water [**Water collect**], the tube dedicated to the HPLC injection [**HPLC tube**] and most of the connecting tubings. The second procedure used both acetone and ethanol to further clean the synthesizer but also to dry all reservoirs [**Reservoir 1-14**], both reactors [**Reactor 1-2**], the tube dedicated to the HPLC injection [**HPLC tube**], the flask allowing the dilution of the HPLC-collected fraction prior to cartridge formulation [**Dilution flask**], the flask required for receiving at last the batch of formulated product [**Product vial**] as well as all tubings connecting these elements.

2.1.1.2. Radiosynthetizer configuration

Valves VZ1 and VZ2 were both turned in up-position for the preparation of [^{18}F]DPA-C5yne [^{18}F]-**16c**, therefore by-passing most of the added functionalities of the TRACERLab FX N Pro synthesizer when compared to the TRACERLab FX-FN (e.g. the second reactor [**Reactor 2**] and its connected reservoirs [**Reservoir 7-11**] and associated tubings). Note that valves VX3 and VX4 as well as the associated option of using an additional cartridge purification unit were also not requested for this process.

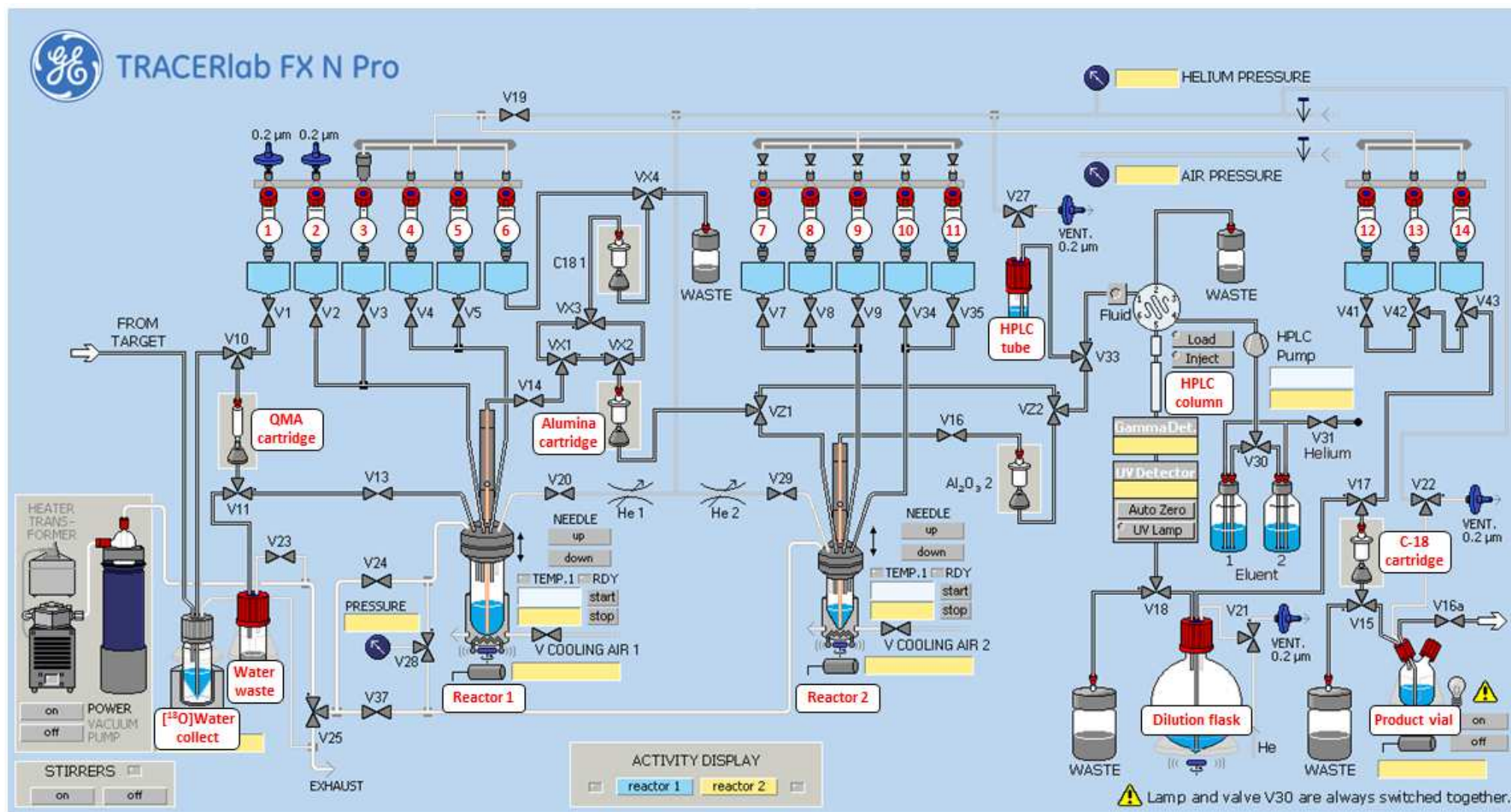


Figure 38. Scheme of the radiosynthesizer TRACERLab FX N Pro.

2.1.1.3. Radiosynthetizer preparation

Prior to [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**) production, the following reservoirs and vessels were filled with the solutions described here: [**Reservoir 1**]: a mixture of deionized water and acetonitrile (30/70 v/v, 1 mL) containing 1.5 mg of K_2CO_3 and 12 to 15 mg of Kryptofix[®] K_{2.2.2}; [**Reservoir 3**]: a DMSO solution (0.7 mL) containing the tosylate **39** (4.0 to 5.0 mg, 7.0-8.7 micromoles) as the labeling precursor; [**Reservoir 4**]: HPLC-solvent (2 mL, see [**HPLC G**]); [**Reservoir 5**]: HPLC-solvent (2 mL, see [**HPLC G**]); [**Reservoir 12**]: distilled water (10 mL); [**Reservoir 13**]: ethanol (1.5 mL); [**Reservoir 14**]: aq. 0.9 % NaCl (8.5 mL); [**Dilution flask**]: distilled water (20 mL). Note that [**Reservoir 2**], [**Reservoir 6**], [**Reservoir 7-11**], [**Reactor 1**], [**Reactor 2**], [**Product vial**], [**HPLC tube**], [^{18}O]Water collect], [**Water waste**] and all other [**WASTE**] were left empty. Additionally, all cartridges requested for the preparation of [^{18}F]DPA-C5yne [^{18}F]-**16c** were, before being mounted on the synthesizer, conditioned as described here: [**QMA cartridge**]: Sep-Pak[®] Light Accell[™] Plus QMA cartridge (Waters), hydroxide form, generated from the chloride form by washing with aq. 1 M NaHCO_3 (2 mL) and rinsed with distilled water (20 mL) and CH_3CN (10 mL); [**Alumina N cartridge**]: Sep-Pak[®] Alumina N[™] cartridge (Waters), washed with distilled water (10 mL); [**C-18 cartridge**]: Sep-Pak[®] Plus C18 cartridge (Waters), washed with EtOH (2 mL) and then rinsed with distilled water (10 mL). The HPLC-column and system was also conditioned with the appropriate solvent (see [**HPLC G**]) and DPA-C5yne (**16c**), as standard, was injected once.

2.1.2. The TRACERLab FX FN

The scheme of the radiosynthetizer TRACERLab FX FN is given in the next page as **Figure 39**.

2.1.2.1. Radiosynthetizer description and sequences used

Fluorine-18-labeling, HPLC purification and formulation of [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) as an *i.v.* injectable solution was performed using a slightly modified TRACERLab FX-FN synthesizer (GE Medical Systems, Germany) (**Figure 39**), placed in a 5.0-cm-lead shielded and ventilated cell. The whole process was thus fully automatized and used a dedicated method supported by three generic “time list”, written according to the programming mode of General Electric synthesis modules, and named respectively “Time list 1: K[^{18}F]F-K_{2.2.2} preparation”, “Time list 2: radiofluorination and pre-purification” and “Time list 3: purification and formulation”. Before each [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) batch production, the synthesizer was cleaned out (e.g. used-cartridge removal), purged from any residual chemicals or solvents left-over (reservoirs, reactors and tubings) from a previous radiotracer production and dried using another in-house programmed method, based on the use of two generic “time list”, named respectively “Time list: clean” and “Time list: clean and dry”.

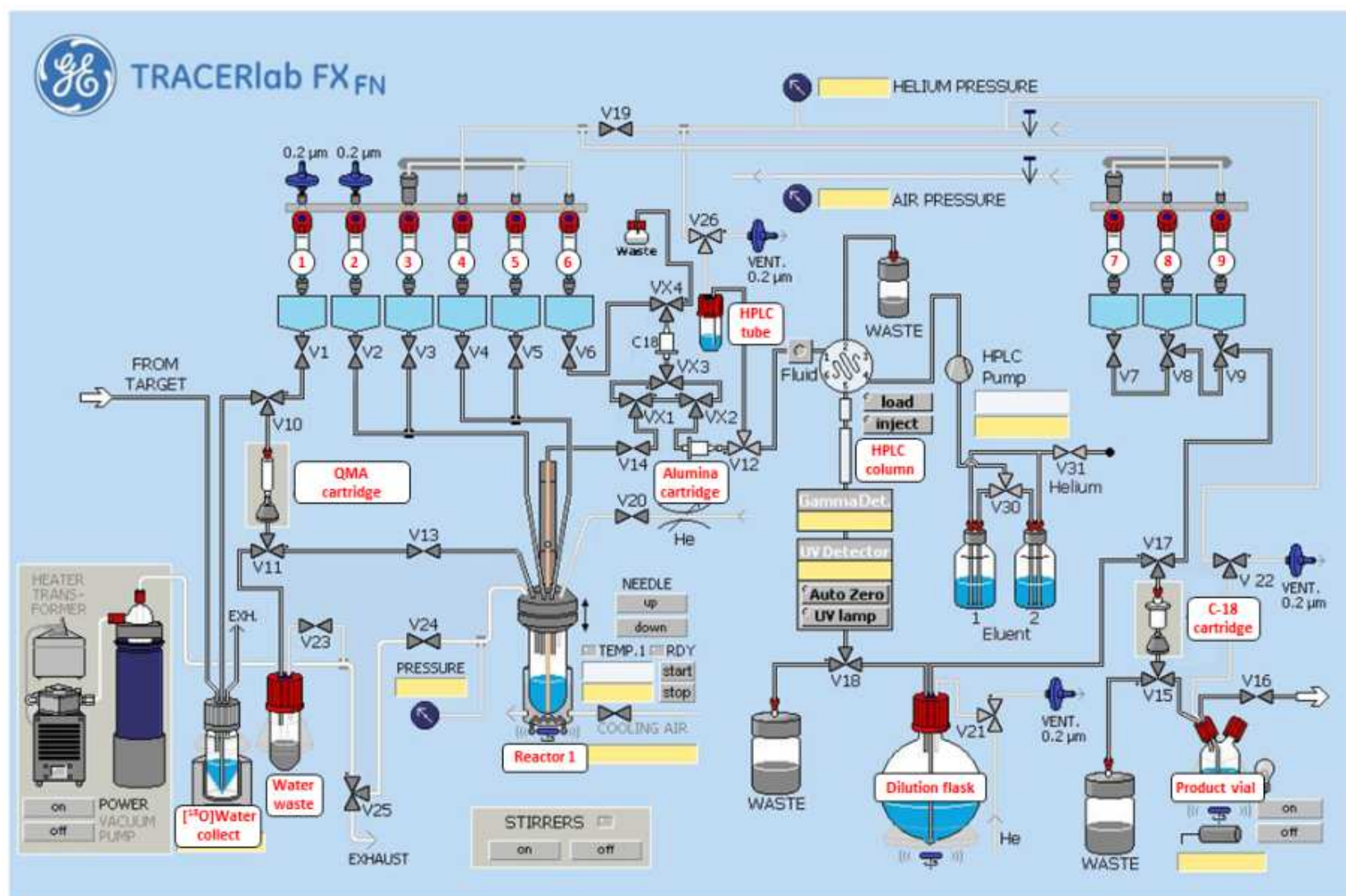


Figure 39. Scheme of the radiosynthesizer TRACERLab FX-FN

2.1.2.2. Radiosynthetizer configuration

The radiosynthetizer was used as is. Note that valves VX3 and VX4 as well as the associated option of using an additional cartridge purification unit were also not requested for this process.

2.1.2.3. Radiosynthetizer preparation

Prior to [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) production, the following reservoirs and vessels were filled with the solutions described here: [**Reservoir 1**]: a mixture of distilled water and acetonitrile (30/70 v/v, 1 mL) containing 1.5 mg of K_2CO_3 and 12 to 15 mg of Kryptofix[®]222 ; [**Reservoir 3**]: a MeCN solution (1 mL) containing the tosylate **40** (4.0 to 5.0 mg, 7.2-9.1 micromoles) as the labeling precursor ; [**Reservoir 4**]: HPLC-solvent (2 mL, see [**HPLC H**]) ; [**Reservoir 5**]: HPLC-solvent (2 mL, see [**HPLC H**]) ; [**Reservoir 7**]: distilled water (10 mL) ; [**Reservoir 8**]: ethanol (1.5 mL) ; [**Reservoir 9**]: physiological saline (8.5 mL, 0.9 % aq. NaCl) ; [**Dilution flask**]: distilled water (20 mL). Note that [**Reservoir 2**], [**Reservoir 6**], [**Reactor 1**], [**Reactor 2**], [**Product vial**], [**HPLC tube**], [**[^{18}O]Water collect**], [**Water waste**] and all other [**WASTE**] were left empty. Additionally, all cartridges requested for the preparation of [^{18}F]CfO-DPA-714 [^{18}F]-**10** were, before being mounted on the synthesizer, conditioned as described here: [**QMA cartridge**]: Sep-Pak[®] Light Accell[™] Plus QMA cartridge (Waters), hydroxide form, generated from the chloride form by washing with aq. 1M NaHCO_3 (2 mL) and rinsed with distilled water (20 mL) and CH_3CN (10 mL) ; [**Alumina N cartridge**]: Sep-Pak[®] Alumina N[™] cartridge (Waters), washed with distilled water (10 mL) ; [**C-18 cartridge**]: Sep-Pak[®] Plus C18 cartridge (Waters), washed with EtOH (2 mL) and then rinsed with distilled water (10 mL). The HPLC column and system was also conditioned with the appropriate solvent (see [**HPLC H**]) and CfO-DPA-714 (**10**), as standard, was injected once.

2.2. Radiosynthesis, purification and formulation

2.2.1. Radiosynthesis of [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**16c**)

2.2.1.1. K[^{18}F]F-K_{2.2.2} preparation

The target content (oxygen-18-enriched water containing [^{18}F]fluorine-18) was transferred to the TRACERLab FX N Pro synthesiser using helium pressure (2 bars) and was first collected in the [**[^{18}O]-water collect**] vial, then sucked through the [**QMA cartridge**]. At this stage, fluorine-18 was trapped as [^{18}F]fluoride onto the cartridge and the oxygen-18-enriched water was collected in the [**Water waste**] vial. [^{18}F]fluoride anions were then released from the cartridge using the solution stored in [**Reservoir 1**] and eluted into [**Reactor 1**]. The mixture was concentrated to dryness using sequentially the following two heating steps: i) 60 °C, 7 min at a pressure ranging between 30 and 35 kPa then ii) 120 °C, 5 min under vacuum. Additional

dilution with CH₃CN followed by azeotropic distillation was not performed. The expected K[¹⁸F]F-K_{2.2.2} complex, ready for the fluorination step, was obtained within 18 min.

2.2.1.2. Fluorine-18 incorporation and pre-purification

The content of the [**Reservoir 3**] (e.g. 4-5 mg of **39** as precursor for labelling in solution in 700 µL of DMSO) was added to the [**Reactor 1**] (the latter containing the above-mentioned K[¹⁸F]F-K_{2.2.2} complex). The [**Reactor 1**] was then heated at 100 °C for 10 min and then cooled down to 50 °C. The content of [**Reservoir 4**] (HPLC solvent, 2 mL) was added to the [**Reactor 1**]. The diluted content of [**Reactor 1**] was then transferred through the [**Alumina cartridge**] and collected in the [**HPLC tube**]. The content of [**Reservoir 5**] (HPLC solvent, 2 mL) was further added to the [**Reactor 1**] and the novel content of [**Reactor 1**] was then analogously transferred (under pressure) through the [**Alumina cartridge**] and collected in the [**HPLC tube**] too. The part of the process described here lasted about 17 min.

2.2.1.3. HPLC-purification and formulation

The cartridge-purified solution (about 4.7 mL) collected in the [**HPLC tube**] was transferred under pressure into the HPLC injection loop (5 mL). HPLC purification started at the signal given by the fluid detector, the latter switching the loop-valve from the “load” position to the “inject” position. HPLC elution [**HPLC G**] was followed by both UV (254 nm) and radioactivity detection. The fraction containing [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**16c**) was collected separately, on the operator’s actions (clicking on the start-collect and end-collect icons), in the [**Dilution flask**], prefilled with water (20 mL). Final formulation of the radiotracer was performed automatically using a Sep-Pak®Plus C18-based system. For this, the content of the [**Dilution flask**] was first passed through the [**C-18 cartridge**] (trapping the radiotracer), the latter being then washed with water (10 mL, stored in the [**Reservoir 12**]). Elution of the cartridge with EtOH (1.5 mL, stored in the [**Reservoir 13**]) afforded [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**16c**) which was recovered in the [**Product flask**]. Addition of 0.9 % aq. NaCl (8.5 mL, stored in the [**Reservoir 14**]) through the [**C-18 cartridge**] was performed at last to complete the formulation step. HPLC-purification and formulation steps lasted about 20-25 min.

2.2.2. Radiosynthesis of [¹⁸F]CfO-DPA-714 ([¹⁸F]-**10**)

2.2.2.1. K[¹⁸F]F-K_{2.2.2} preparation

The target content (oxygen-18-enriched water containing [¹⁸F]fluorine-18) was transferred to the TRACERLab FX-FN synthesiser using helium pressure (2 bars) and was first collected in the [[¹⁸O]-water collect] vial, then sucked through the [**QMA cartridge**]. At this stage, fluorine-18 was trapped as [¹⁸F]fluoride onto the cartridge and the oxygen-18-enriched water

was collected in the [**Water waste**] vial. [^{18}F]fluoride anions were then released from the cartridge using the solution stored in [**Reservoir 1**] and eluted into [**Reactor 1**]. The mixture was concentrated to dryness using sequentially the following two heating steps: i) 60 °C, 7 min at a pressure ranging between 30 and 35 kPa then ii) 120 °C, 5 min under vacuum. Additional dilution with CH_3CN followed by azeotropic distillation was not performed. The expected $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}-\text{K}_{2.2.2}$ complex, ready for the fluorination step, was obtained within 19 min.

2.2.2.2. Fluorine-18 incorporation and pre-purification

The content of the [**Reservoir 3**] (e.g. 4-4.5 mg of **40** as precursor for labeling in solution in 1 mL of CH_3CN) was added to the [**Reactor 1**] (the latter containing the above-mentioned $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}-\text{K}_{2.2.2}$ complex). The [**Reactor 1**] was then heated at 160 °C for 5 min and then cooled down to 50 °C. The content of [**Reservoir 4**] (HPLC eluent, 2 mL) was added to [**Reactor 1**]. The diluted content of [**Reactor 1**] was then transferred under pressure through the [**Alumina cartridge**] and collected in the [**HPLC tube**]. [**Reactor 1**] was rinsed with the content of [**Reservoir 5**] (HPLC eluent, 2 mL) which was then transferred through the [**Alumina cartridge**] and collected in the [**HPLC tube**] too. The part of the process described here lasted about 17 min.

2.2.2.3. HPLC-purification and formulation

The cartridge-purified solution (about 4.7 mL) collected in the [**HPLC tube**] was transferred under pressure into the HPLC injection loop (5 mL). HPLC purification started at the signal given by the fluid detector, the latter switching the loop-valve from the “load” position to the “inject” position. HPLC elution [**HPLC H**] was followed by both UV (254 nm) and radioactivity detection. The fraction containing [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) was collected separately, on the operator’s actions (clicking on the start-collect and end-collect icons), in the [**Dilution flask**], prefilled with water (20 mL). Final formulation of the radiotracer was performed automatically using a Sep-Pak®Plus C18-based system. For this, the content of the [**Dilution flask**] was first passed through the [**C-18 cartridge**] (trapping the radiotracer), the latter being then washed with water (10 mL, stored in the [**Reservoir 7**]). Elution of the cartridge with EtOH (1.5 mL, stored in the [**Reservoir 8**]) afforded [^{18}F]CfO-DPA-714 ([^{18}F]-**10**) which was recovered in the [**Product flask**]. Addition of 0.9 % aq. NaCl (8.5 mL, stored in the [**Reservoir 9**]) through the [**C-18 cartridge**] was performed at last to complete the formulation step. HPLC-purification and formulation steps lasted about 17 min.

3. Quality control of the radiotracers

The following 5 tests were performed for both radiotracers in order to ensure their quality.

3.1. Appearance test

The radiotracer preparation was visually inspected behind a lead-shielded glass window for clarity and absence of particules.

3.2. pH test

The pH was determined using standard pH-paper (Duotest[®], Macherey-Nagel, pH 1-12) using an aliquot of the radiotracer preparation.

3.3. Identification, chemical and radiochemical purity test

Identification as well as chemical and radiochemical purity determinations were assessed by separate analytical-HPLC analysis, using a sample of authentic compound as standard. For this, an aliquot of the radiotracer preparation (5 to 20 μ L) was injected in HPLC [**HPLC E** for [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**16c**) and **HPLC F** for [¹⁸F]CfO-DPA-714 ([¹⁸F]-**10**)]. The chemical identity was determined with UV-spectrometric analysis by comparing the recorded retention time with the one observed for the corresponding reference compound in the same HPLC system and conditions. Chemical purity was also assessed on the UV-chromatogram based on the relative integration of the peak areas. Radiochemical identity was confirmed by comparison of the retention time of the radioactive compound with the corresponding non-radioactive reference compound. Radiochemical purity was assessed on the radioactive chromatogram based on the relative integration of the peak area corresponding to the radiotracer.

3.4. Specific radioactivity determination

Specific radioactivity of the radiotracer was calculated from three consecutive HPLC analyses. For this, an aliquot of the radiotracer preparation (5 to 20 μ L) was injected in HPLC [**HPLC E** for [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**16c**) and **HPLC F** for [¹⁸F]CfO-DPA-714 ([¹⁸F]-**10**)] and for each injection, the area of the UV absorbance peak corresponding to the product was measured (integrated) on the HPLC chromatogram and compared to a standard curve relating mass to UV absorbance, allowing the determination of the corresponding mass. The HPLC fraction corresponding to the peak was also collected in a vial, and its radioactivity measured in an ionization chamber (Capintec, CRC-15R, France). The SRA, as a mean of three independent experiments, was calculated by dividing the counted radioactivity by the found mass (triplicate).

3.5. On-shelf stability test

Chemical and radiochemical stability of the entire preparation were assessed by HPLC too. For this, aliquots of the radiotracer preparation (20 μ L) were injected onto HPLC [**HPLC E** for [18 F]DPA-C5yne (18 F]-**16c**) and **HPLC F** for [18 F]CfO-DPA-714 (18 F]-**10**)] at regular 15-min intervals during 120 min. For each injection, the chemical and radiochemical purity was determined (see above). Moreover, for each injection, the mass associated to the peak corresponding to the product was calculated (using the standard curve relating mass to UV absorbance) and its radioactivity also measured, before being then corrected for the decay of fluorine-18. Values of both mass and decay-corrected radioactivity per sample were plotted against time and fitted for linearity.

Chapter 3: *In vitro* autoradiography and *in vivo* PET imaging

1. Description of the neuroinflammatory animal model used

Striatal AMPA-mediated excitotoxicity and acute local neuroinflammation in the brain of Wistar rats was induced according to reported procedures.

The protocol used includes a stereotactic injection in the right striatum of 0.5 μ L of AMPA ((*R,S*)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionic acid, 15 mM in phosphate buffered saline (PBS) buffer) in anaesthetized and normothermally-controlled animals followed by a resting period of 7 days.

2. *In vitro* autoradiography

Brain slices of unilaterally AMPA-lesioned animals were prepared according to reported procedures.

The protocol used includes decapitation of the animals under terminal anaesthesia, quick brain removal and freezing in cold (-80 °C, dry-ice) isopentane followed by coronally, 10 μ m-thick slicing of the brain at the level of the lesion. Then, adjacent brain slices (36 slices from the center of the lesioned area) were taken and incubated for 20 min in Tris Buffer (TRIZMA pre-set Crystals, Sigma®, adjusted at pH 7.4 at 4 °C, 50 mM with NaCl 120 mM) containing the radiotracer alone (typically 2,4-3,2 mCi, 90-120 MBq, 60-90 GBq/ μ mol, < 10 nM), or with PK11195 (20 μ M), or with the non-radiolabelled reference compound (CfO-DPA-714 or DPA-C5yne, 20 μ M) or with Flumazenil (20 μ M).

Brain sections were then washed 2 times for 2 min and once for 10 sec with cold (4°C) buffer, then exposed on a Phosphor-Imager screen overnight. Autoradiograms were scanned and then analysed using the ImageJ software (developed by the National Institutes of Health). A region of interest (ROI) was manually drawn around the core of the lesion, and an identical area was copy-pasted symmetrically into the contralateral hemisphere. Binding in the ROI was then expressed as the number of counts per surface unit. The target-to-background ratio (TBR) was calculated as the ratio of the binding in the lesioned versus the contralateral hemisphere.

3. *In vivo* μ PET imaging

Rats ($n = 4$, 355 ± 22.5 g) were imaged with the radiotracer alone seven days after intrastriatal injection of AMPA using a small-animal-dedicated, INVEON PET/CT or PET only tomograph (Siemens, Germany).

Anesthesia of animals was induced by a mixture of isoflurane and O₂ (3 % / 97 %). Animals were then placed in a home-made stereotaxic frame compatible with PET acquisition, maintained anesthetized by using only a 1.5 % - 2.5 % mixture of isoflurane in O₂ and

maintained normothermic using a heating pad (Heater Pad Biovet®, m2m Imaging Corp., Cleveland, USA).

Animals were injected with the radiotracer (0.90 to 1.1 mCi, 33-41 GBq, 3 to 20 nmol) in the caudal lateral vein using a 24 gauge catheter. Imaging started at the time of injection of the radiotracer and lasted for 60 min. 3D-PET acquisitions were performed with the coincidence time window set to 3.432 nsec and the energy levels of discrimination set to 350 keV and 650 keV. The list mode file of the emission scans was histogrammed into 24 dynamic frames (3 x 30 sec, 5 x 60 sec, 5 x 2 min, 3 x 3 min, 3 x 3 min, 4 x 5 min and 1 x 10 min) with a maximum ring difference of 79 and a span of 3. A 3D attenuation correction file was generated with correction factors either measured using an external cobalt-57 point source or using the CT X-ray source. The emission sinograms were then normalized and corrected for attenuation and radioactivity decay. 3D images were reconstructed with the Fourier rebinning (FORE) and ordered-subsets expectation-maximization, 2-dimensional (OSEM 2D) algorithms (16 subsets and 4 iterations).

Image analysis and quantification of radioactivity uptake in volumes of interest (VOIs) were performed using Brain-Visa / Anatomist version 3.1 developed in-house¹⁴¹. On the ipsilateral side, delineation of the lesion area was made by manual segmentation on the summed-frame images spanning the last 30 min of the PET acquisition. A region of interest was drawn on each adjacent transaxial section containing the lesion and combined to define a volume of interest (VOI). On the contralateral side, an ovoid VOI (4 x 4 x 4 voxels, 22 mm³) was manually positioned in the center of the striatum. These VOIs were then projected onto all dynamic frames and the resulting time activity curves were then normalized for the percentage of injected dose per milliliter (%ID / mL).

¹⁴¹ Y. Cointepas, J.-F. Mangin, L. Garnero, J.-B. Poline, H. Benali. *Neuroimage* **2001**, 13, S98.

Annexes

Publication n°1 : publiée dans la revue « *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* »

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24 (2014) 1550–1556



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Preparation and evaluation of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine acetamides, closely related to DPA-714, as potent ligands for imaging the TSPO 18 kDa with PET



Vincent Médran-Navarrete^a, Annelaure Damont^{a,*}, Marie-Anne Peyronneau^a, Bertrand Kuhnast^a, Nicholas Bernards^{a,b}, Géraldine Pottier^{a,b}, Frank Marguet^c, Frédéric Puech^c, Raphaël Boisgard^{a,b}, Frédéric Dollé^a

^aCEA, I2BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay, France

^bInserm, U1023, Université Paris Sud, Orsay, France

^cExploratory Unit, Sanofi, Chilly-Mazarin, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2013

Revised 24 January 2014

Accepted 27 January 2014

Available online 7 February 2014

Keywords:

DPA-714 analogues

TSPO 18 kDa

Fluorinated ligands

Metabolism

PET imaging

ABSTRACT

A series of four novel analogues of DPA-714, bearing a fluoroalkynyl side chain (with a length ranging from three to six carbon atoms) in replacement of the fluoroethoxy motif, have been synthesized in six steps from commercially available methyl 4-iodobenzoate. The synthetic strategy for the preparation of these *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(ω -fluoroalk-1-ynyl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamides (**7a–d**) consisted in derivatizing a key iodinated building block featuring the pyrazolopyrimidine acetamide backbone of DPA-714, by Sonogashira couplings with various alkynyl reagents. The resulting alkynols were subsequently fluorinated, yielding the expected target derivatives. All four analogues exhibited slightly higher affinity and selectivity towards the TSPO 18 kDa (K_i vs [3 H]PK11195: 0.35–0.79 nM; K_i vs [3 H]flunitrazepam: >1000 nM) when compared to DPA-714 (K_i vs [3 H]PK11195: 0.91 nM; K_i vs [3 H]flunitrazepam: >1000 nM). Lipophilicities (HPLC, $\log D_{7.4}$) increased with the chain length (from 3.6 to 4.3) and were significantly higher than the one determined for DPA-714 (2.9). Preliminary in vitro metabolism evaluation using rat microsomal incubations and LC–MS analyses showed, for all four novel analogues, the absence of defluorinated metabolites. Among them, the fluoropentynyl compound, DPA-C5yne (**7c**), was selected, labelled in one single step with fluorine-18 from the corresponding tosylate and in vivo evaluated with PET on our in-house-developed rat model of acute local neuroinflammation.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The translocator protein (TSPO 18 kDa), formerly known as the peripheral benzodiazepine receptor (PBR), is a highly lipophilic tryptophan-rich protein comprising 169 amino acids.^{1–3} It is located in the outer mitochondrial membrane of cells where it combines with a 32 kDa voltage-dependent anion channel (VDAC) and a 30 kDa adenine nucleotide carrier (ANC).^{3,4} This trimeric complex, involved in the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), plays an important role in certain transport processes. For example, it is well-established that TSPO controls the translocation of cholesterol from the outer to inner mitochondrial membrane, where it is converted to pregnenolone, a key intermediate for the biosynthesis of steroids.⁵ While it is minimally produced in the healthy brain,⁶ the translocator protein is

overexpressed in inflamed brains.^{7–9} As a result, TSPO has become over the years an attractive biological target for imaging neuroinflammatory disorders, for example in Alzheimer's or Parkinson's disease, using PET.¹⁰

Regarding TSPO tracers, the first PET-radioligand synthesized, the isoquinoline carboxamide [11 C]PK11195 (Fig. 1), has been used clinically since 1984.¹¹ Even though it is still considered as a standard, [11 C]PK11195 presents serious limitations for PET imaging such as a poor signal-to-noise ratio and low brain penetration as well as the short radioactive half-life of carbon-11 ($t_{1/2}$ = 20.4 min).¹² These drawbacks have encouraged the design of improved radiotracers.^{13–18} For instance, in the phenoxyphenyl acetamide class, [11 C]DAA1106 was found to exhibit a higher specificity^{19–21} and its fluorinated analogue, FEDAA1106, labelled with the longer half-lived positron-emitter fluorine-18 ($t_{1/2}$ = 109.8 min), turned out to be also a better radioligand, with a better signal-to-noise ratio

* Corresponding author.

E-mail address: annelaure.damont@cea.fr (A. Damont).

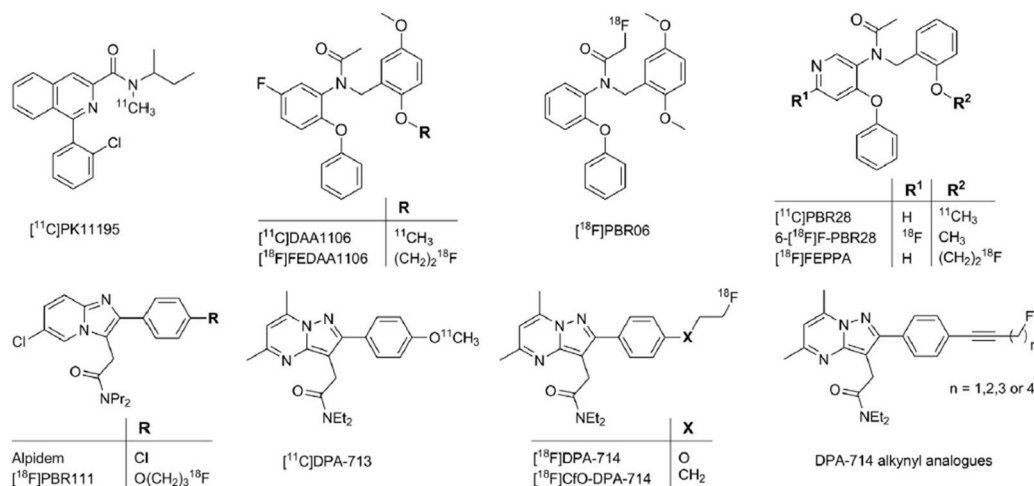


Figure 1. Selected TSPO ligands, including, at the right bottom corner, the general structure of the DPA-714 alkynyl analogues synthesized in the present work.

compared to $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$.^{22,23} $[^{18}\text{F}]\text{PBR06}$ is another representative of this series that has been labelled with introduction of the fluorine-18 at the *N*-acyl function.^{24,25} Concomitantly, carbon-11 or fluorine-18-labelled compounds featuring a pyridine motif were developed. Among them, $[^{11}\text{C}]\text{PBR28}$, a ligand displaying encouraging in vivo imaging properties,^{26–32} and the fluorinated analogues 6- $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-PBR28}$ and $[^{18}\text{F}]\text{FEPPA}$, were reported in the literature.^{33–35}

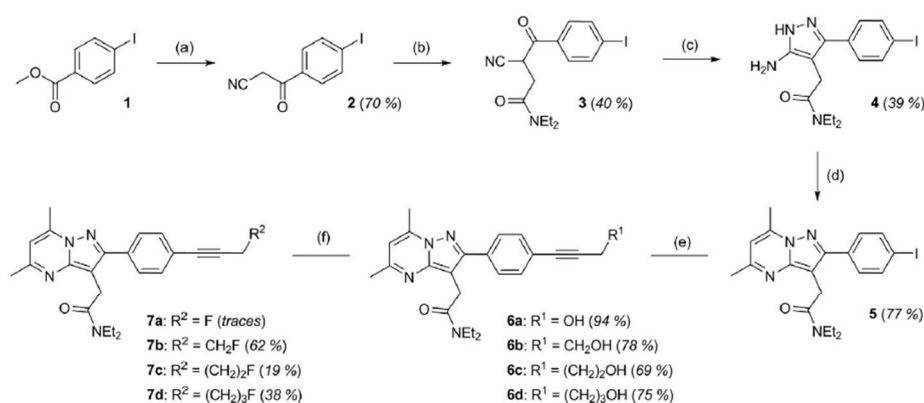
Another class of high affinity TSPO ligands gathers compounds related to the imidazopyridine alpidem³⁶ (Fig. 1). A well-known fluorine-18-labelled example of this class is $[^{18}\text{F}]\text{PBR111}$.^{37,38} Bioisosteric derivatives such as pyrazolopyrimidine acetamides have also been developed to target the TSPO. Within this sub-class, the best known compounds are $[^{11}\text{C}]\text{DPA-713}$ ^{39–45} and $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ ^{42,43,46–59} (Fig. 1), both already in vivo evaluated at the preclinical and clinical stage. Even though $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ has a slightly higher lipophilicity than $[^{11}\text{C}]\text{DPA-713}$, which could lead to an increased non-specific binding, this radioactive compound allows longer imaging protocols and therefore can be considered as a more suitable radiotracer. The use of radioligands belonging to this class may also facilitate accurate quantitative interpretation of the PET data. Indeed, pyrazolopyrimidine acetamides show a relatively low difference in affinity (~ 4 fold) between the high- (HABs) and the low- or the mixed-affinity binders (LABs/MABs), when compared to the *N*-benzyl-*N*-(2-phenoxyaryl) acetamides PBR06 (~ 17 fold) or PBR28 (~ 50 fold).^{60–62} Thus, the impact of inter-individual variations which are linked to the expression of different TSPO binding sites encoded by the rs6971 polymorphism at the gene level could be reduced, and may not require subject genotyping.

Recent studies clearly demonstrated $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ that rapidly and extensively undergoes in vivo metabolism in both rodents (rats) and non-human primates (baboons). In particular, the observed fluoroethoxy side chain cleavage leads to the formation of small radiometabolites entering the brain and lowering PET imaging quality and restraining quantitative analysis.^{63,64} Regarding this metabolic pathway, we intended to improve DPA-714 stability by replacing the oxygen atom bridging the phenyl group and the fluoroethyl motif by a methylene unit. Such a modification gave rise to a new compound named CFO-DPA-714 whose corresponding fluorine-18-labelled version ($[^{18}\text{F}]\text{CFO-DPA-714}$, Fig. 1) has recently been prepared and is currently evaluated in vivo.⁶⁵

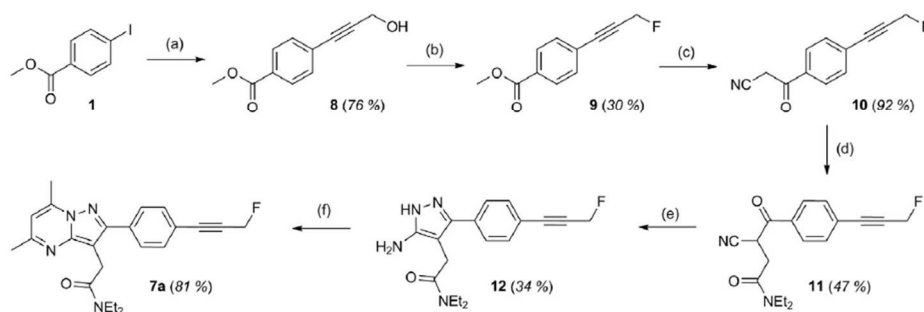
In this article, we report the chemical synthesis (Schemes 1 and 2) of a new subclass of DPA-714 analogues featuring an alkyne triple bond and a short alkane spacer linking the pyrazolopyrimidine scaffold and the fluorine atom (Fig. 1). The series includes four compounds with a side chain ranging from three to six carbon atoms (7a–d). Preliminary evaluation of some of their physical and in vitro biological properties ($\log D_{7.4}$, K_i against $[^3\text{H}]\text{PK11195}$ and $[^3\text{H}]\text{flunitrazepam}$) as well as in vitro metabolism studies for all four compounds are described. In addition, fluorine-18-labelling and first in vivo PET-imaging of one of them is also presented herein.

The synthesis of DPA-714 alkynyl analogues 7a–d was envisaged from the key iodopyrazolopyrimidine 5 using the pathway depicted in Scheme 1.

Thus, the synthesis of compounds 7a–d started with a nucleophilic addition of acetonitrile carbanion on the commercially available methyl 4-iodobenzoate 1, leading to 3-oxopropanenitrile 2 upon the loss of the methoxide moiety. The reaction, initially performed with NaOMe in boiling acetonitrile,³⁹ was improved by using *n*-BuLi as a base at low temperature.⁶⁶ This strategy allowed to decrease ester hydrolysis and resulted in an improved reaction yield of 70% compared to maximum 45% when using NaOMe. The resulting β -ketonitrile 2 was then C-alkylated with *N,N*-diethylchloroacetamide in presence of NaI in ethanolic sodium hydroxide. This reaction usually took a few days to reach completion and resulted in the formation of the expected *N,N*-diethylamide 3 with a modest yield of 40%. In the next step, compound 3 was subjected to a first cyclization using monohydrated hydrazine in refluxing acetic acid to lead to the aminopyrazole 4 which was isolated in a moderate yield of 39%. Finally, reaction of compound 4 with acetylacetone in boiling ethanol for 5 h allowed the pyrazolopyrimidine ring formation in 77% yield, and moreover in a clean and easy way since no side-product formation was observed. While cooling down the reaction mixture, the iodopyrazolopyrimidine 5 often crystallized in a pure form (shiny white solid) that did not require additional purification. In our synthesis strategy, compound 5 was a key intermediate since it could give access to a wide range of fluorinated alkynyl compounds in a straightforward (two steps) and versatile way. To generate the analogues 7a–d, first Sonogashira couplings between 5 and the appropriate alkynyl alcohols were carried out to give the alkynols 6a–d in good to excellent yields (69–94%). Then, compounds 6a–d were submitted to fluoro-deoxygenation using Deoxofluor[®] in methylene chloride to yield



Scheme 1. Synthesis of the DPA-714 alkynyl analogues **7a–d**. Reagents and conditions: (a) *n*-BuLi, CH₃CN, THF, 30 min, –65 °C then methyl 4-iodobenzoate (**1**), 2 h, –65 °C to –45 °C; (b) NaOH, EtOH, 15 min then ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, 4 days, rt; (c) N₂H₄·H₂O, AcOH, EtOH, 5–8 h, 80 °C; (d) acetylacetone, EtOH, 5 h, 80 °C; (e) alkynyl alcohol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, Et₂NH, 24 h, rt; (f) Deoxofluor®, CH₂Cl₂, 2–4 days, rt.



Scheme 2. Synthesis of the DPA-714 alkynyl analogue **7a**. Reagents and conditions: (a) 2-propyn-1-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, Et₂NH, 24 h, rt; (b) deoxofluor®, CH₂Cl₂, 2 days, rt; (c) *n*-BuLi, CH₃CN, THF, 30 min, –60 °C then compound **9**, 2 h, –60 °C; (d) NaOH, EtOH, 15 min then ClCH₂C(O)NEt₂, NaI, 4 days, rt; (e) N₂H₄·H₂O, AcOH, EtOH, 5 h, 80 °C; (f) acetylacetone, EtOH, 8 h, 80 °C.

7b–d with variable efficiency (19–62%). Typically, the reaction mixture was worked up after 48 h. For analogue **7b**, it is important not to run the reaction for too long otherwise a side-product involving allene formation is produced.

Finally, analogues **7b–d** were produced in six steps with chemical purities higher than 95% (¹H NMR). Their structures were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS (Table 1).⁶⁷

Regarding the analogue **7a**, since the fluorodeoxygenation turned out to be only partially successful when applied to alcohol **6a**, a different pathway was considered (Scheme 2). For the preparation of this compound (**7a**), the major improvement was made by performing the fluorination at the very beginning of the synthesis as depicted below (Scheme 2).

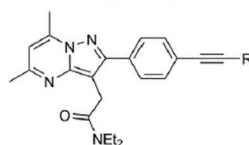
Thus, starting with the iodoester **1**, a Sonogashira coupling using 2-propyn-1-ol was first carried out to yield the propargylic alcohol **8** in 76% yield. Then, **8** was submitted to fluorodeoxygenation using Deoxofluor® at room temperature in methylene chloride. Although this reaction was not clean (several by-products were observed on TLC), the fluoroester **9** was successfully isolated with a good purity in 30% yield. The oxopropanenitrile **10** was then obtained in good to excellent yields (92%) using similar conditions to those previously described. Analogously, C-alkylation with *N*, *N*-diethylchloroacetamide gave the amide **11** in a moderate 47% yield. Cyclisation with hydrazine led to the aminopyrazole **12** in a moderate yield of 34%, and was further converted to the pyrazolopyrimidine **7a** (81% yield). Finally, the target fluoropropynyl

compound **7a** was also obtained in six steps with a high purity and its structure was confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS (Table 1).⁶⁷

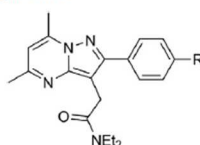
The log_{D7.4} (*n*-octanol/buffer pH 7.4 partition coefficient) of compounds **7a–d** were evaluated on the basis of their HPLC retention times⁶⁸ and were also calculated using the ACD 11.0 software (Table 2). As expected, both measured and calculated log_{D7.4} values were higher than those calculated for DPA-714, and increased as the fluorinated side chain *R* lengthened. Additionally, while analogues **7a** and **7b** exhibited comparable experimental log_{D7.4} values, 3.61 and 3.67 respectively, **7c** and **7d** were found to be significantly more lipophilic with values slightly above 4.0.

The in vitro binding affinities of compounds **7a–d** for the TSPO 18 kDa were determined by competition with [³H]PK11195 using membrane homogenates from rat heart. All four analogues exhibited high affinities for the protein with subnanomolar *K_i* values—all lower than the one measured for DPA-714 in the same assays—ranging from 0.35 nM (**7c**) to 0.79 nM (**7d**), as well as high specificity since no affinity for the central benzodiazepine receptor (CBR) was observed (Table 2).

The metabolism of the four novel DPA-714 fluoroalkynyl analogues (**7a–d**) was also studied in vitro in rat liver microsomes.⁶⁴ Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS and MS–MS) analyses, after 30 minutes of incubation, allowed the detection of the main metabolites formed for each analogue. The formation of two to four metabolites (M1–M4) was observed as summarized

Table 1Analytical characterization (MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR data) of DPA-714 fluoroalkynyl analogues **7a–d**

Compd	R	MW	m/z^{ab}	Fluoroalkynyl side chain ^1H NMR chemical shifts (δ , ppm, CDCl_3) ^{c,d}	Fluoroalkynyl side chain ^{13}C NMR chemical shifts (δ , ppm, CDCl_3) ^{c,d}
7a	$\text{CH}_2\text{—F}$	392	393	5.20 (d, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 47.6$ Hz)	89.5 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 12$ Hz, C], 83.2 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 22$ Hz, C], 71.1 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 164$ Hz, CH_2]
7b	$(\text{CH}_2)_2\text{—F}$	406	407	4.60 (dt, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 46.8$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.8$ Hz), 2.86 (dt, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 19.2$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.8$ Hz), 4.62 (dt, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$ Hz), 2.59 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.01 (dq ⁵ , 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 25.6$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$ Hz)	89.4 [C], 85.1 [C], 81.3 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 171$ Hz, CH_2], 21.6 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 24$ Hz, CH_2]
7c	$(\text{CH}_2)_3\text{—F}$	420	421	4.62 (dt, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$ Hz), 2.59 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.01 (dq ⁵ , 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 25.6$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$ Hz)	89.3 [C], 82.5 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 164$ Hz, CH_2], 81.2 [C], 29.5 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 20$ Hz, CH_2], 15.4 [d, $J_{\text{CF}}^3 = 4$ Hz, CH_2]
7d	$(\text{CH}_2)_4\text{—F}$	434	435	4.52 (dt, 2H, $J_{\text{HF}}^2 = 47.2$ Hz, $J_{\text{HH}}^3 = 6.0$ Hz), 2.50 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.89 (m, 2H), 1.75 (q ⁵ , 2H, $J = 7.2$ Hz)	90.3 [C], 83.6 [d, $J_{\text{CF}}^1 = 164$ Hz, CH_2], 81.1 [C], 29.5 [d, $J_{\text{CF}}^2 = 20$ Hz, CH_2], 24.4 [d, $J_{\text{CF}}^3 = 5$ Hz, CH_2], 19.1 [CH ₂]

^a ESI⁺ ionization.^b Value corresponding to the $[\text{M}+\text{H}]^+$ peak.^c Recorded on a 400 MHz Bruker avance.^d See note⁶⁷ in the 'references and notes' section for a complete NMR description of compounds **7a–d**.**Table 2**Lipophilicities and binding affinities of the DPA-714 fluoroalkynyl analogues **7a–d**

Compd	R	HPLC t_R (min) ^a	$\text{Log } D_{7.4}^b$	$c \text{Log } D_{7.4}^c$	K_i (TSPO) ^d (nM)	K_i (CBR) ^e (nM)
DPA-714	$\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{—F}$	1.10	2.89	3.21	0.91	>1000
7a	$\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2\text{—F}$	1.19	3.61	3.81	0.54	>1000
7b	$\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_3\text{—F}$	1.20	3.67	4.19	0.74	>1000
7c	$\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_4\text{—F}$	1.30	4.06	4.58	0.35	>1000
7d	$\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_5\text{—F}$	1.33	4.35	5.03	0.79	>1000

^a HPLC conditions: UPLC/SQD Acquity BEH C18 column, 2.1×50 mm, $1.7 \mu\text{m}$, mobile phase: H_2O (A)/ CH_3CN + 0.1% formic acid (B), gradient: 2–100% (B) in 3 min, 1.0 mL/min.^b See note⁶⁸ in the 'references and notes' section for description of the $\text{log } D_{7.4}$ determination method using HPLC.^c Calculated with ACD 11.0 software.^d K_i values were determined using membrane homogenates from rat heart and screened against [^3H]PK11195 ($K_d = 1.8$ nM, $C = 0.2$ nM).^e K_i Values were determined using membrane homogenates from rat cerebral cortex and screened against [^3H]flunitrazepam ($K_d = 2.1$ nM, $C = 0.4$ nM).

in **Table 3**. For all four analogues **7a–d**, no metabolites resulting from the loss of the fluorine atom by cleavage of the fluoroalkynyl side chain was observed by LC–MS. The predominant metabolites, detected by HPLC at 275 nm and characterised by ESI–MS–MS analyses according to their fragmentation profiles, resulted from N-deethylation (M1, -28 Da) at the diethylacetamide position and also from hydroxylation (M2 and M3, $+16$ Da) or dihydroxylation (M4, $+32$ Da) most probably on the methyl groups of the pyrazolo-pyrimidine part of the molecule as already observed for DPA-714.⁶⁴

The fluoropentynyl analogue **7c** (coded DPA-C5yne), displaying the highest TSPO binding affinity and a favourable in vitro metabolic profile, was chosen for radiofluorination^{69,70} and first in vivo evaluation as potential PET imaging tool. Indeed, despite the good in vitro profile of the fluoropropynyl analogue **7a** that features an improved TSPO affinity in comparison to DPA-714, a better lipophilicity value than **7c** and only two main in vitro

metabolites after 30 min microsomal incubation, compound **7c** was preferred based on (i) the difficulties encountered to generate the corresponding precursor for labelling (tosyloxy derivative of **6a**) and (ii) our past experience with compounds bearing comparable motif, e.g. the predicted issues to get efficient radiolabelling.

Thus, the tosylate **13** was prepared from the alkynol **6c** by treatment with *p*-toluenesulfonic anhydride in dichloromethane in the presence of TEA at room temperature for 2–3 days, and obtained in 54% yield. Fluorine-18 labelling was then performed in a single-step procedure by nucleophilic aliphatic substitution using the activated $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{-Kryptofix } K_{222}$ complex as the fluorinating reagent, in DMSO and heating at 100°C for 10 min⁷¹ on a TRACER-Lab FX N Pro synthesizer (GEMS). Ready-to-inject [^{18}F]-**7c** (>99% chemically and radiochemically pure, 55–110 GBq/ μmol) was obtained in 20–25% decay-corrected yields (based on starting [^{18}F]fluoride) and within 50–60 min, semi-preparative HPLC purification and SepPak® Plus-based formulation included (**Scheme 3**).

Table 3
Microsomal metabolites of the DPA-714 fluoroalkynyl analogues **7a–d** (LC–MS and MS–MS analyses)

7a (m/z 392)

7b (m/z 406)

Compds	<i>t_R</i> ^a (min)	[M+H] ⁺	Fragments ^b	<i>t_R</i> ^a (min)	[M+H] ⁺	Fragments ^b
Parent	15.66	393	375, 346, 320, 292	15.81	407	389, 360, 334, 306
M1	11.41	365 (–28)	347, 320, 292	11.68	379 (–28)	361, 334, 306
M2	11.0	409 (+16)	391, 362, 336, 308	11.19	423 (+16)	405, 376, 350, 322
M3	—	—	—	10.01	423 (+16)	405, 376, 350, 322
M4	—	—	—	5.89	439 (+32)	421, 392, 366, 338

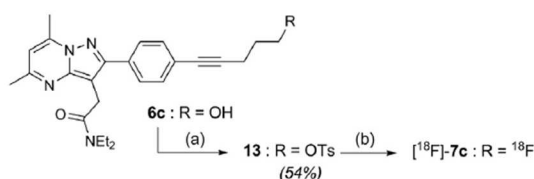
7c (m/z 420)

7d (m/z 434)

Compds	<i>t_R</i> ^a (min)	[M+H] ⁺	Fragments ^b	<i>t_R</i> ^a (min)	[M+H] ⁺	Fragments ^b
Parent	17.05	421	403, 348, 320	15.81	435	417, 362, 334
M1	12.08	393 (–28)	375, 348, 320	11.68	407 (–28)	362, 334, 306
M2	11.37	437 (+16)	419, 364, 336	11.19	451 (+16)	433, 404, 378, 350
M3	8.92	437 (+16)	419, 364, 336	10.01	451 (+16)	433, 404, 378, 350
M4	3.43	453 (+32)	435, 380, 353	5.89	467 (+32)	449, 420, 394, 366

^a HPLC conditions: Atlantis C18 column, 2.1 × 150 mm, 5 μm, mobile phase: H₂O + 0.05% formic acid (A)/CH₃CN + 0.05% formic acid (B), gradient (A/B): 60:40–20:80 (20 min), 200 μL/min, detection at 275 nm.

^b See Ref. 64 in the 'references and notes' section for a complete description of the materials and methods used for ESI–MS–MS analyses.



Scheme 3. Synthesis of the labelling precursor **13** and radioligand [¹⁸F]-**7c**. Reagents and conditions: (a) Ts₂O, CH₂Cl₂, TEA, rt, 3 h; (b) (i) K[¹⁸F]F-K₂CO₃, DMSO, 100 °C, 10 min, (ii) cartridge purification (SepPak® Alumina NTM), (iii) HPLC purification (Waters Symmetry® C-18).

First imaging properties of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**7c**) were investigated in vivo with PET (INVEON PET/CT and PET only tomographs, Siemens) and compared to [¹⁸F]DPA-714 on our in-house-developed rat model of acute local neuroinflammation. MicroPET studies were performed on anesthetized brain-lesioned Wistar rats 7 days after AMPA injection in their right striatum.⁴³ As shown in Figure 2A, the lesion (indicated by the white cross-cursor) could clearly be identified within the rat's brain from 5 minutes post-injection of [¹⁸F]-**7c** until the end of the PET acquisition. A relatively high contrast between the lesioned area and the corresponding area in the intact contralateral hemisphere was also observed. Uptake of [¹⁸F]-**7c** in the lesioned striatum was high (0.24 percent of injected dose per milliliter (% ID/mL) at 60 min, Fig. 2B) but slightly lower than the one routinely observed for [¹⁸F]DPA-714 (0.30% ID/mL, same time). Uptake of [¹⁸F]-**7c** in the contralateral side was also significantly lower

(0.05% ID/mL at 60 min) than the one reported for [¹⁸F]DPA-714 (0.08% ID/mL at 60 min, respectively). Thus, an in vivo ipsilateral-to-contralateral ratio of 4.62 ± 0.4 ($p < 0.0001$), calculated as the bound tracer in the lesion versus the bound tracer in the contralateral side at 60 min post-injection, was found for [¹⁸F]-**7c**, a notably higher value than the one measured for [¹⁸F]DPA-714 (3.71 ± 0.4 ($p < 0.001$) or [¹¹C]PK11195 (1.65 ± 0.2 ($p < 0.001$), data not shown).

Four novel closely related analogues of DPA-714 (**7a–d**) featuring a fluoroalkynyl side chain in replacement of the fluoroethoxy motif, have been synthesized in six steps from commercially available methyl 4-iodobenzoate. All target derivatives showed a high affinity and specificity toward the TSPO 18 kDa (as the parent molecule DPA-714). These compounds (**7a–d**) exhibited rather high lipophilicities compared to DPA-714, which nevertheless, keeps in the range favored for good passive cerebral penetration. Preliminary in vitro metabolism evaluation using rat microsomal incubations and LC–MS analyses have confirmed, for all derivatives, the stability of the chosen fluorination position, that is the alkynyl side chain. This results portend, in contrast to [¹⁸F]DPA-714, the absence in vivo of small interfering radiofluorinated metabolites formation. Among the four analogues prepared, the fluoropentynyl compound **7c** was successfully labelled with fluorine-18 and its subsequent first PET in vivo evaluation has demonstrated its potential to image the TSPO 18 kDa. Additional studies, including in vivo metabolism analysis, in acute and chronic models of neurodegeneration will be performed in order to further evaluate the potential of this radioligand as a biomarker of neuroinflammation in neuropathological conditions.

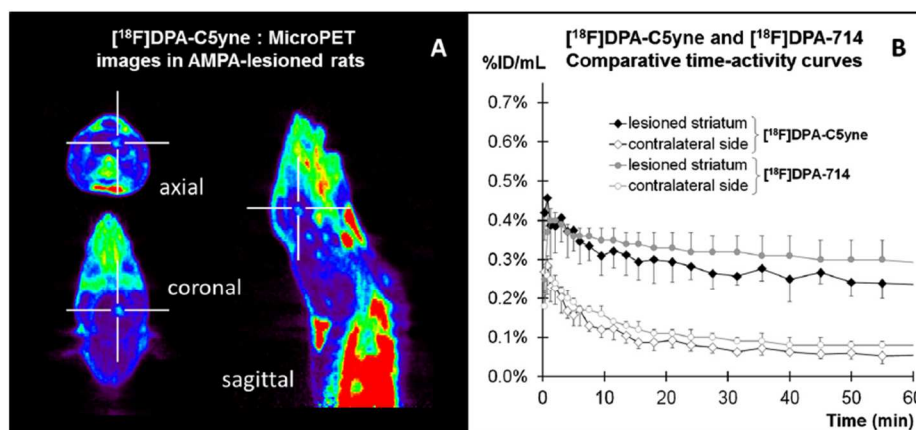


Figure 2. (A) MicroPET axial, coronal and sagittal summed images (5–60 min) following iv injection of [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-7c) in AMPA-lesioned rat. A cross-cursor indicates in each section the visible right-side lesion. (B) Comparative time-activity curves expressed in between [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-7c) and [^{18}F]DPA-714. Data are expressed in percent of injected dose per milliliter (% ID/mL) versus minutes (min).

Acknowledgments

The authors wish to thank LGCR Analytical Sciences (Sanofi, Chilly Mazarin) for logD measurements, Cyrielle Letaillandier for her technical assistance as well as Dr. Dirk Roeda for proof reading the manuscript and suggesting linguistic corrections. This work was supported by CEA-I²BM intramural programs, as well as the European Union's Seventh Framework Programme [FP7/2007–2013] INMiND (Grant agreement n° HEALTH-F2-2011-278850). PhD students Vincent Médran-Navarrete and Nicholas Bernards were in part supported by a CEA Irtelis doctoral grant and the EU FP7 INMiND program (see above), respectively.

References and notes

- Beurdeley-Thomas, A.; Miccoli, L.; Oudard, S.; Dutrillaux, B.; Poupon, M. F. *J. Neurooncol.* **2000**, *46*, 45.
- Joseph-Liauzun, E.; Delmas, P.; Shire, D.; Ferrara, P. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2146.
- Papadopoulos, V.; Baraldi, M.; Guilarte, T. R.; Knudsen, T. B.; Lacapere, J.-J.; Lindemann, P.; Norenberg, M. D.; Nutt, D.; Weizman, A.; Zhang, M.-R.; Gavish, M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 402.
- Casellas, P.; Galiegue, S.; Basile, A. S. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 475.
- Papadopoulos, V.; Brown, A. S. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *53*, 103.
- Gavish, M.; Bachman, I.; Shoukrun, R.; Katz, Y.; Veenman, L.; Weisinger, G.; Weizman, A. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 629.
- Bourguignon, J. J. In *Endogenous and Synthetic Ligands of Mitochondrial Benzodiazepine Receptors: Structure-Affinity Relationships*, Peripheral Benzodiazepine Receptors; Giensen-Crouse, E., Ed.; Academic Press: London, 1993; pp 59–85.
- Kettenmann, H.; Burton, G. A.; Moenning, U. J. In *Neuroinflammation—from Bench to Bedside*; Ernst Schering Research Foundation, Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2002; pp 1–234.
- Raghavendra Rao, V. L.; Dogan, A.; Bowen, K. K.; Dempsey, R. J. *Exp. Neurol.* **2000**, *161*, 102.
- Rupprecht, R.; Papadopoulos, V.; Rammes, G.; Baghai, T. C.; Fan, J.; Akula, N.; Grover, G.; Adams, D.; Schumacher, M. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2010**, *9*, 971.
- Camsonne, R.; Crouzel, C.; Comar, D.; Mazière, M.; Prenant, C.; Sastre, J.; Moulin, M. A.; Syrota, A. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1984**, *21*, 985.
- Banati, R. B.; Newcombe, J.; Gunn, R. N.; Cagnin, A.; Turkheimer, F.; Heppner, F.; Price, G.; Wegner, F.; Giovannoni, G.; Miller, D. H.; Perkin, D. G.; Smith, T.; Hewson, A. K.; Bydder, G.; Kreutzberg, G. W.; Jones, T.; Cuzner, M. L.; Myers, R. *Brain* **2000**, *123*, 2321.
- Chauveau, F.; Boutin, H.; Van Camp, N.; Dollé, F.; Tavittian, B. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 2304.
- Dollé, F.; Luus, C.; Reynolds, A.; Kassiou, M. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2899.
- Luus, C.; Hanani, R.; Reynolds, A.; Kassiou, M. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 501.
- Scarf, A. M.; Kassiou, M. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 677.
- Roeda, D.; Kuhnast, B.; Damont, A.; Dollé, F. *J. Fluorine Chem.* **2012**, *134*, 107.
- Ching, A. S. C.; Kuhnast, B.; Damont, A.; Roeda, D.; Tavittian, B.; Dollé, F. *Insights Imaging* **2012**, *3*, 111.
- Maeda, J.; Suhara, T.; Zhang, M. R.; Okauki, T.; Yasuno, F.; Ikoma, Y.; Inaji, M.; Nagai, Y.; Takano, A.; Obayashi, S.; Suzuki, K. *Synapse* **2004**, *52*, 283.
- Chaki, S.; Funakoshi, T.; Yoshikawa, R.; Okuyama, S.; Okubo, T.; Nakazato, A.; Nagamine, M.; Tomisawa, K. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *371*, 197.
- Zhang, M. R.; Kida, T.; Noguchi, J.; Furutsuka, K.; Maeda, J.; Suhara, T.; Suzuki, K. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 513.
- Fujimura, Y.; Ikoma, Y.; Yasuno, F.; Suhara, T.; Ota, M.; Matsumoto, R.; Nozaki, S.; Takano, A.; Kosaka, J.; Zhang, M. R.; Nakao, R.; Suzuki, K.; Kato, N.; Ito, H. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 43.
- Zhang, M. R.; Maeda, J.; Ogawa, M.; Noguchi, J.; Ito, T.; Yoshida, Y.; Okauchi, T.; Obayashi, S.; Suhara, T.; Suzuki, K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 228.
- Briard, E.; Shah, J.; Musachio, J. L.; Zoghbi, S. S.; Fujita, M.; Imaizumi, M.; Cropley, V.; Innis, R. B.; Pike, V. W. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2005**, *48*, S4.
- Briard, E.; Zoghbi, S. S.; Simeon, F. G.; Imaizumi, M.; Gourley, J. P.; Shetty, H. U.; Lu, S. Y.; Fujita, M.; Innis, R. B.; Pike, V. W. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 688.
- Briard, E.; Hong, J.; Musachio, J. L.; Zoghbi, S. S.; Fujita, M.; Imaizumi, M.; Cropley, V.; Innis, R. B.; Pike, V. W. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2005**, *48*, S71.
- Imaizumi, M.; Kim, H.-J.; Zoghbi, S. S.; Briard, E.; Hong, J.; Musachio, J. L.; Ruetzler, C.; Chuang, D. M.; Pike, V. W.; Innis, R. B.; Fujita, M. *Neurosci. Lett.* **2007**, *411*, 200.
- Brown, A. K.; Fujita, M.; Fujimura, Y.; Liow, J.-S.; Stabin, M.; Ryu, Y. H.; Imaizumi, M.; Hong, J.; Pike, V. W.; Innis, R. B. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 2072.
- Briard, E.; Zoghbi, S. S.; Imaizumi, M.; Gourley, J. P.; Hong, J.; Cropley, V.; Fujita, M.; Innis, R. B.; Pike, V. W. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 17.
- Imaizumi, M.; Briard, E.; Zoghbi, S. S.; Gourley, J. P.; Hong, J.; Fujimura, Y.; Pike, V. W.; Innis, R. B.; Fujita, M. *NeuroImage* **2008**, *39*, 1289.
- Fujita, M.; Imaizumi, M.; Zoghbi, S. S.; Fujimura, Y.; Farris, A. G.; Suhara, T.; Hong, J.; Pike, V. W.; Innis, R. B. *NeuroImage* **2008**, *40*, 43.
- Kreisl, W. C.; Fujita, M.; Fujimura, Y.; Kimura, N.; Jenko, K. J.; Kannan, P.; Hong, J.; Morse, C. L.; Zoghbi, S. S.; Gladding, R. L.; Jacobson, S.; Oh, U.; Pike, V. W.; Innis, R. B. *NeuroImage* **2010**, *49*, 2924.
- Damont, A.; Boisgard, R.; Kuhnast, B.; Lemée, F.; Raggiri, G.; Scarf, A. M.; Da Pozzo, E.; Selli, S.; Martini, C.; Tavittian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4819.
- Wilson, A. A.; Garcia, A.; Parkes, J.; McCormick, P.; Stephenson, K. A.; Houle, S.; Vasdev, N. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 305.
- Mizrahi, R.; Rusjan, P. M.; Vitcu, I.; Ng, A.; Wilson, A. A.; Houle, S.; Bloomfield, P. M. *Mol. Imag. Biol.* **2013**, *15*, 353.
- Selli, S.; Bruni, F.; Costagli, C.; Costanzo, A.; Guerrini, G.; Ciciani, G.; Costa, B.; Martini, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2661.
- Fookes, C. J. R.; Pham, T. Q.; Mattner, F.; Greguric, I.; Loc'h, C.; Liu, X.; Berghofer, P.; Shepherd, R.; Grégoire, M.-C.; Katsifis, A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3700.
- Dollé, F.; Hinnen, F.; Damont, A.; Kuhnast, B.; Fookes, C.; Pham, T.; Tavittian, B.; Katsifis, A. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 435.
- James, M. L.; Fulton, R. R.; Henderson, D. J.; Eberl, S.; Meikle, S. R.; Thomson, R.; Allan, D.; Dollé, F.; Fulham, M. J.; Kassiou, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6188.
- Thominiaux, C.; Dollé, F.; James, M.; Bramoullé, Y.; Boutin, H.; Besret, L.; Grégoire, M.-C.; Valette, H.; Bottlaender, M.; Tavittian, B.; Hantraye, P.; Selli, S.; Kassiou, M. *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, *64*, 570.
- Boutin, H.; Chauveau, F.; Thominiaux, C.; Kuhnast, B.; Grégoire, M.-C.; James, M.; Jan, S.; Brulon, V.; Fontyn, Y.; Selli, S.; Tréboussier, R.; Hantraye, P.; Dollé, F.; Tavittian, B.; Kassiou, M. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 573.

42. Doorduyn, J.; Klein, H. C.; Dierckx, R. A.; James, M.; Kassiou, M.; de Vries, E. F. J. *Mol. Imag. Biol.* **2009**, *11*, 386.
43. Chauveau, F.; Van Camp, N.; Dollé, F.; Kuhnast, B.; Hinnen, F.; Damont, A.; Boutin, H.; James, M. L.; Kassiou, M.; Tavitian, B. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 468.
44. Leaver, K. R.; Reynolds, A.; Bodard, S.; Guilloteau, D.; Chalon, S.; Kassiou, M. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 114.
45. Endres, C. J.; Coughlin, J. M.; Gage, K. L.; Watkins, C. C.; Kassiou, M.; Pomper, M. G. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 330.
46. James, M. L.; Fulton, R. R.; Vercouillie, J.; Henderson, D. J.; Garreau, L.; Chalon, S.; Dollé, F.; Costa, B.; Guilloteau, D.; Kassiou, M. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 814.
47. Damont, A.; Hinnen, F.; Kuhnast, B.; Schollhorn-Peyronneau, M. A.; James, M. L.; Luus, C.; Tavitian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 286.
48. Fookes, C.; Pham, T.; Mattner, F.; Greguric, I.; Loc'h, C.; Liu, X.; Berghofer, P.; Shepherd, R.; Grégoire, M. C.; Katsifis, A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3700.
49. Martin, A.; Boisgard, R.; Theze, B.; Van Camp, N.; Kuhnast, B.; Damont, A.; Kassiou, M.; Dollé, F.; Tavitian, B. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 230.
50. Martin, A.; Boisgard, R.; Kassiou, M.; Dollé, F.; Tavitian, B. *Mol. Imag. Biol.* **2011**, *13*, 10.
51. Zheng, J.; Boisgard, R.; Siquier-Pernet, K.; Decaudin, D.; Dollé, F.; Tavitian, B. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 823.
52. Winkeler, A.; Boisgard, R.; Awde, A. R.; Dubois, A.; Thézé, B.; Zheng, J.; Ciobanu, L.; Dollé, F.; Viel, T.; Jacobs, A. H.; Tavitian, B. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 811.
53. Tang, D.; Hight, M. R.; McKinley, E. T.; Fu, A.; Buck, J. R.; Smith, R. A.; Tantawy, M. N.; Peterson, T. E.; Colvin, D. C.; Ansari, M. S.; Nickels, M.; Manning, H. C. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 287.
54. Arlicot, N.; Vercouillie, J.; Ribeiro, M. J.; Tauber, C.; Venel, Y.; Baulieu, J. L.; Maia, S.; Corcia, P.; Stabin, M. G.; Reynolds, A.; Kassiou, M.; Guilloteau, D. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39*, 570.
55. Abourbeh, G.; Thézé, B.; Maroy, R.; Dubois, A.; Brulon, V.; Fontyn, F.; Dollé, F.; Tavitian, B.; Boisgard, R. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 5728.
56. Lavis, S.; Guillermer, M.; Hérard, A. S.; Petit, F.; Delahaye, M.; Van Camp, N.; Ben Haim, L.; Lebon, V.; Remy, P.; Dollé, F.; Delzescaux, T.; Bonvento, G.; Hantraye, P.; Escartin, C. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 10809.
57. Kuhnast, B.; Damont, A.; Hinnen, F.; Catarina, T.; Demphel, S.; Le Helleix, S.; Coulon, C.; Goutal, S.; Gervais, P.; Dollé, F. *Appl. Radiat. Isot.* **2012**, *70*, 489.
58. Corcia, P.; Tauber, C.; Vercouillie, J.; Arlicot, N.; Prunier, C.; Praline, J.; Nicolas, G.; Venel, Y.; Hommet, C.; Baulieu, J. L.; Cottier, J. P.; Roussel, C.; Kassiou, M.; Guilloteau, D.; Ribeiro, M. J. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52941.
59. Boutin, H.; Prenant, C.; Maroy, R.; Galea, J.; Greenhalgh, A. D.; Smigova, A.; Cawthorne, C.; Julian, P.; Wilkinson, S. M.; Banister, S. D.; Brown, G.; Herholz, K.; Kassiou, M.; Rothwell, N. J. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56441.
60. Owen, D. R.; Howell, O. W.; Tang, S. P.; Wells, L. A.; Bennacef, I.; Bergström, M.; Gunn, R. N.; Rabiner, E. A.; Wilkins, M. R.; Reynolds, R.; Matthews, P. M.; Parker, C. A. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 1608.
61. Owen, D. R.; Gunn, R. N.; Rabiner, E. A.; Bennacef, I.; Fujita, M.; Kreisl, W. C.; Innis, R. B.; Pike, V. W.; Reynolds, R.; Matthews, P. M.; Parker, C. A. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 24.
62. Owen, D. R.; Yeo, A. J.; Gunn, R. N.; Song, K.; Wadsworth, G.; Lewis, A.; Rhodes, C.; Pulford, D. J.; Bennacef, I.; Parker, C. A.; Sjejan, P. L.; Cardon, L. R.; Mooser, V. E.; Matthews, P. M.; Rabiner, E. A.; Rubio, J. P. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32*, 1.
63. Peyronneau, M. A.; Damont, A.; Valette, H.; Saba, W.; Delforge, J.; Goutal, S.; Bourgeois, S.; Hinnen, F.; Dollé, F.; Bottlaender, M. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2009**, *52*, S385.
64. Peyronneau, M. A.; Saba, W.; Goutal, S.; Damont, A.; Dollé, F.; Kassiou, M.; Bottlaender, M.; Valette, H. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 122.
65. Damont, A.; Ching, A. S. C.; Médran-Navarrete, V.; Kuhnast, B.; Gaudy, H.; Dollé, F. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2011**, *54*, S461.
66. Fernandez, M.-C.; Castaño, A.; Dominguez, E.; Escibano, A.; Jiang, D.; Jimenez, A.; Hong, E.; Hornback, W. J.; Nisenbaum, E. S.; Rankl, N.; Tromiczak, E.; Vaught, G.; Zarrinmayeh, H.; Zimmerman, D. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5057.
67. **Spectroscopic data:** Compound 7a: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.83 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.55 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.55 (s, 1H), 5.20 (d, 2H, $J_{\text{HF}} = 47.6$ Hz), 3.95 (s, 2H), 3.52 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.75 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 169.7 [C], 157.7 [C], 154.2 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 134.4 [C], 131.9 [2 \times CH], 128.5 [2 \times CH], 121.5 [d, $J_{\text{CF}} = 4$ Hz, C], 108.5 [CH], 101.4 [C], 89.5 [d, $J_{\text{CF}} = 12$ Hz, C], 83.2 [d, $J_{\text{CF}} = 22$ Hz, C], 71.1 [d, $J_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 42.3 [CH $_2$], 40.6 [CH $_2$], 27.9 [CH $_2$], 24.4 [CH $_3$], 16.8 [CH $_3$], 14.3 [CH $_3$], 13.0 [CH $_3$]. Compound 7b: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.77 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.48 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.52 (s, 1H), 4.60 (dt, 2H, $J_{\text{HF}} = 46.8$ Hz, $J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 3.94 (s, 2H), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.86 (dt, 2H, $J_{\text{HF}} = 19.2$ Hz, $J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 2.73 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 1.24 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.0 [C], 147.5 [C], 145.1 [C], 133.2 [C], 131.7 [2 \times CH], 128.5 [2 \times CH], 123.1 [C], 108.3 [CH], 101.3 [C], 89.4 [C], 85.1 [d, $J_{\text{CF}} = 6$ Hz, C], 81.3 [d, $J_{\text{CF}} = 171$ Hz, CH_2], 42.2 [CH $_2$], 40.6 [CH $_2$], 28.0 [CH $_2$], 24.1 [CH $_3$], 21.6 [d, $J_{\text{CF}} = 24$ Hz, CH_2], 16.9 [CH $_3$], 14.3 [CH $_3$], 13.0 [CH $_3$]. Compound 7c: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.76 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.47 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.54 (s, 1H), 4.62 (dt, 2H, $J_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz), 3.97 (s, 2H), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.41 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.76 (s, 3H), 2.59 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.58 (s, 3H), 2.01 (dq 2 , 2H, $J_{\text{HF}} = 25.6$ Hz, $J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.12 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.4 [C], 145.2 [C], 133.0 [C], 131.6 [2 \times CH], 128.4 [2 \times CH], 123.5 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 89.3 [C], 82.5 [d, $J_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 81.2 [C], 42.2 [CH $_2$], 40.6 [CH $_2$], 29.5 [d, $J_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 28.0 [CH $_2$], 24.3 [CH $_3$], 16.9 [CH $_3$], 15.4 [d, $J_{\text{CF}} = 4$ Hz, CH_2], 14.3 [CH $_3$], 13.0 [CH $_3$]. Compound 7d: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.76 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.46 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.54 (s, 1H), 4.52 (dt, 2H, $J_{\text{HF}} = 47.2$ Hz, $J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz), 3.96 (s, 2H), 3.50 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.42 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.75 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.50 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.89 (m, 2H), 1.75 (q 2 , 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.20 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.10 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 169.6 [C], 157.6 [C], 154.9 [C], 147.5 [C], 146.0 [C], 132.7 [C], 131.6 [2 \times CH], 128.4 [2 \times CH], 123.8 [C], 108.3 [CH], 101.3 [C], 90.3 [C], 83.6 [d, $J_{\text{CF}} = 164$ Hz, CH_2], 81.1 [C], 42.2 [CH $_2$], 40.6 [CH $_2$], 29.5 [d, $J_{\text{CF}} = 20$ Hz, CH_2], 28.0 [CH $_2$], 24.4 [d, $J_{\text{CF}} = 5$ Hz, CH_2], 23.9 [CH $_3$], 19.1 [CH $_2$], 16.9 [CH $_3$], 14.2 [CH $_3$], 13.0 [CH $_3$].
68. **Determination of $\log D_{7.4}$ (HPLC):** The retention time recorded for the tested compound was converted into its $\log D_{7.4}$ value using a validated, standardized HPLC method (correlation between retention times and known $\log D$ values of similar compounds). HPLC conditions: Alliance 2695—PDA Waters, X-Terra MS C18 (4.6 \times 20 mm, 3.5 μm) column; mobile phase 5 mM MOPS/(CH $_3$) $_4$ NOH pH 7.4 (A), 5% MOPS/(CH $_3$) $_4$ NOH (100 mM, pH 7.4)/95% CH $_3$ CN (B); gradient (A/B): 98:2 (0.5 min), 0:100 (4.8 min), 98:2 (1.6 min); 1.2 mL/min; 25 $^\circ\text{C}$; detection at 254 nm.
69. Dollé, F. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*, 63.
70. Damont, A.; Roeda, D.; Dollé, F. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*, 96.
71. Dollé, F.; Roeda, D.; Kuhnast, B.; Lasne, M.-C. In *Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals*; Tressaud, A., Haufe, G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2008; pp 3–65.

[¹⁸F]DPA-C5yne, a novel fluorine-18-labelled analogue of DPA-714: radiosynthesis and preliminary evaluation as a radiotracer for imaging neuroinflammation with PET

Vincent Médran-Navarrete,^{a,†} Nicholas Bernards,^{a,b,†} Bertrand Kuhnast,^a
Annelaure Damont,^a Géraldine Pottier,^{a,b} Marie-Anne Peyronneau,^a
Michael Kassiou,^{c,d} Frank Marguet,^e Frédéric Puech,^e
Raphaël Boisgard,^{a,b} and Frédéric Dollé^{a,*}

DPA-C5yne, the lead compound of a novel series of DPA-714 derivatives in which the fluoroethoxy chain linked to the phenylpyrazolopyrimidine scaffold has been replaced by a fluoroalkyn-1-yl moiety, is a high affinity (K_i : 0.35 nM) and selective ligand targeting the translocator protein 18 kDa. In the present work, DPA-C5yne was labelled with no-carrier-added [¹⁸F]fluoride based on a one-step tosyloxy-for-fluorine nucleophilic substitution reaction, purified by cartridge and HPLC, and formulated as an *i.v.* injectable solution using a TRACERLab FX N Pro synthesizer. Typically, 4.3–5.2 GBq of [¹⁸F]DPA-C5yne, ready-to-use, chemically and radiochemically pure (> 95%), was obtained with specific radioactivities ranging from 55 to 110 GBq/μmol within 50–60 min, starting from a 30 GBq [¹⁸F]fluoride batch (14–17%). LogP and LogD of [¹⁸F]DPA-C5yne were measured using the shake-flask method and values of 2.39 and 2.51 were found, respectively. Autoradiography studies performed on slices of ((R,S)-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionique (AMPA)-lesioned rat brains showed a high target-to-background ratio (1.9 ± 0.3). Selectivity and specificity of the binding for the translocator protein was demonstrated using DPA-C5yne (unlabelled), PK11195 and Flumazenil (central benzodiazepine receptor ligand) as competitors. Furthermore, DPA-C5yne proved to be stable in plasma at 37°C for at least 90 min.

Keywords: fluorine-18; radiosynthesis; DPA-C5yne; DPA-714; TSPO 18 kDa; PBR

Introduction

Overexpression of the translocator protein (TSPO) 18 kDa (formerly known as the peripheral benzodiazepine receptor (PBR)¹) in the brain, during microglial cell activation in response to cerebral insults, has attracted considerable attention for the development of positron emission tomography (PET) radioligands as imaging markers of neuroinflammation.^{2,3}

While several radioligands are still underdevelopment,^{4–9} the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-acetamide [¹⁸F]DPA-714^{10–12} is currently considered as a major challenger^{13–23} of the reference ligand, the isoquinoline-carboxamide [¹¹C]PK11195,^{24,25} together with the phenoxypyridin-3-yl-acetamide [¹¹C]PBR28^{26–32} and its closely related fluorinated analogue [¹⁸F]FEPPA.^{33,34} However, the use of radioligands belonging to the latter class faces difficulties today in human PET imaging because of differences between individuals linked to the variable expression of two binding sites (a low and a high affinity) for the TSPO, encoded by a single polymorphism (rs6971) at the gene level.^{35–37} Subjects may thus be classified as high-affinity binders or low-affinity binders (when one single binding site for the TSPO is expressed with either high or low affinity, but may also be classified as mixed affinity binders when both sites are expressed

approximately equally. Differences in affinity are higher for [¹¹C]PBR28 (50-fold), whereas pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-acetamides show lower differences (only fourfold for [¹¹C]DPA-713).³⁶

On the other hand, recent in-house studies have demonstrated that [¹⁸F]DPA-714 is extensively metabolized *in vivo* in both rodents and non-human primates.³⁸ One metabolic pathway, which was demonstrated *in vitro* and was also suggested to occur *in vivo*, results from *O*-dealkylation that leads to the formation of fluorine-18-labelled small metabolites such as [¹⁸F]fluoroacetaldehyde, or its oxidation product [¹⁸F]fluoroacetic acid.

^aCEA, [†]BM, Service Hospitalier, Frédéric Joliot, Orsay, France

^bInserm, U1023, Université Paris Sud, Orsay, France

^cSchool of Chemistry, University of Sydney, Sydney, Australia

^dDiscipline of Medical Radiation Sciences, University of Sydney, Sydney, Australia

^eExploratory Unit, Sanofi, Paris, France

*Correspondence to: Dr Frédéric Dollé, Service hospitalier Frédéric Joliot, Institut d'imagerie biomédicale, CEA, 4 place du Général Leclerc, F-91406 Orsay, France. E-mail: frederic.dolle@cea.fr

[†]These two authors equally contributed to the work.

The main issue is that [^{18}F]fluoroacetate is known to cross the blood brain barrier at a certain level^{39–41} and may thus confound the brain PET signal. Moreover, [^{18}F]fluoroacetate may be converted to [^{18}F]fluoride ion,^{42–44} which bind avidly to the bones, including the skull.⁴⁵ This accumulation of radioactivity in the skull is also problematic as far as brain imaging is concerned because it interferes with the quantification of the radiotracer due to the partial volume effect.⁴⁵

Consequently, structural modifications of the DPA-714/DPA-713 chemotype that could prevent *O*-dealkylation and thus avoid the formation of [^{18}F]fluoroacetate and [^{18}F]fluoride ions were explored. While keeping the scaffold of DPA-714, new analogues have recently been synthesized, in which the oxygen atom bridging the phenyl ring and the fluoroalkyl chain is replaced with a carbon atom. Of particular interest is a novel subclass of compounds featuring an alkyne bond and a short alkane spacer linking the phenylpyrazolopyrimidine scaffold and the fluorine atom.⁴⁶ This series includes four analogues of DPA-714 with a side-chain length ranging from three to six carbon atoms, which all exhibit high affinity and selectivity towards the TSPO. Within this series, DPA-C5yne (**1**, Figure 1) exhibited the highest affinity for the TSPO with a K_i value of 0.35 nM (as reference, the K_i measured for DPA-714 in the same assay was 0.91 nM). No affinity for the central benzodiazepine receptor (CBR) was observed ($K_i > 1 \mu\text{M}$).⁴⁶ Furthermore, preliminary *in vitro* metabolism evaluation of this series using rat microsomal incubations and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) analyses showed the absence of defluorinated metabolites.⁴⁶

Based on these data, DPA-C5yne (**1**) was selected for labelling with the short-lived positron-emitter fluorine-18 ($T_{1/2}$: 109.8 min). The present manuscript briefly describes the preparation of the tosyloxy derivative as precursor for labelling and then focuses on the radiolabelling with fluorine-18 of **1** on a TRACERLab FX N Pro module, the measurement of its lipophilicity (LogP/LogD) based on the shake-flask method and its preliminary evaluation by autoradiography on brain slices of our in-house-developed rat model of acute local neuroinflammation.

Results and discussion

Chemistry

The preparation of DPA-C5yne (**1**, *N,N*-diethyl-2-(2-(4-(3-fluoropent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide) as reference compound and the tosylate **2** (6-(4-(3-(2-

(diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)phenyl)pent-4-yn-1-yl) 4-methylbenzenesulfonate) as precursor for labelling with fluorine-18 is illustrated in Scheme 1. Briefly, both compounds were synthesized in a single step from the alkynol **3**, the latter being prepared in five chemical steps from commercially available methyl 4-iodobenzoate.⁴⁶ Then, fluorodeoxygenation of **3** was performed using Deoxofluor[®] (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in dichloromethane at room temperature for 3 days and afforded the corresponding fluorinated compound, DPA-C5yne (**1**), in 24% yield. The tosylate **2** was also prepared from the alkynol **3**, by treatment with 4-toluenesulfonic anhydride in dichloromethane at room temperature for 2–3 days, and obtained in 54% yield.

Radiochemistry

DPA-C5yne (**1**) was labelled with fluorine-18 from the tosyloxy derivative **2**, purified by HPLC and formulated as an *i.v.* injectable solution by implementing the one-step radiochemical process outlined in Scheme 2. The whole procedure was performed using a commercially available TRACERLab FX N Pro synthesizer (GE Medical Systems, Germany). The positioning of all reagents, solvents and consumables dedicated to the preparation of [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**1**) on the TRACERLab FX N Pro is illustrated on the control screen copy displayed in Figure 2. Further details are given in the Experimental Section.

No-carrier-added K[^{18}F]F-Kryptofix[®] 222 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) complex^{47,48} was prepared from cyclotron-produced [^{18}F]fluoride, K_2CO_3 , Kryptofix[®] 222, acetonitrile and water using a step-by-step sequence (time list) developed by GEMS and implemented on the synthesizer at its reception on site. The sequence includes the trapping of [^{18}F]fluoride anions on a dedicated QMA cartridge, their release using a $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ solution containing both K_2CO_3 and Kryptofix[®] 222 and a two-step concentration-to-dryness process in a vessel (reactor) made from glassy carbon. K[^{18}F]F-Kryptofix[®] 222 was obtained in 18 min and used without any additional drying sequence.

Radiofluorination was then performed by dilution of the aforementioned reagent using a DMSO solution (700 μL) containing 7.0–8.7 μmoles (4.0–5.0 mg) of the tosylate **2**, followed by stirring and heating. Initially, the conditions used were those optimized for the preparation of [^{18}F]DPA-714, for example, 165°C for 5 min.¹² Using the latter, [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**1**) was formed and could be isolated after cartridge/HPLC purifications (see in the succeeding texts). However, overall

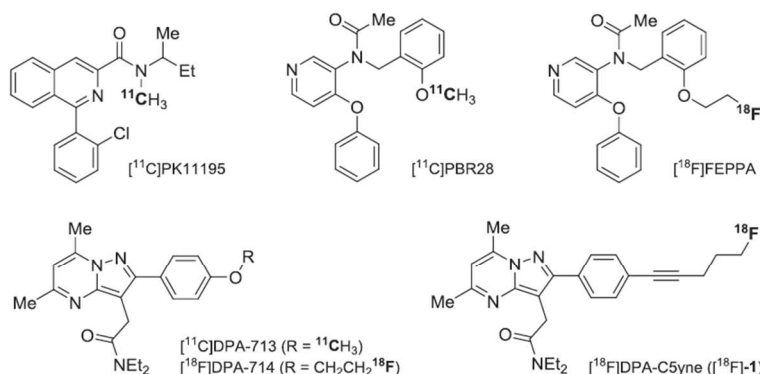
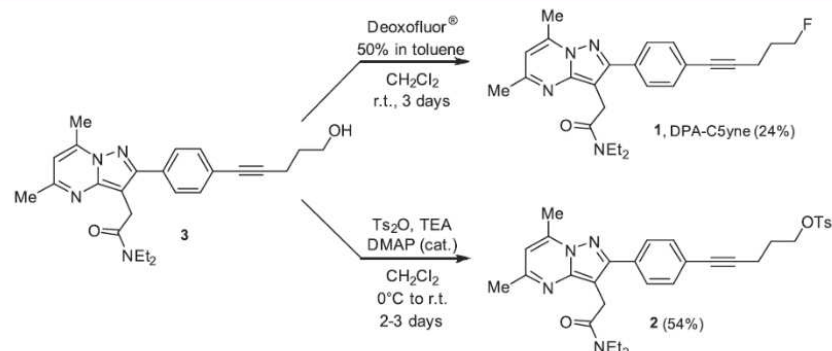
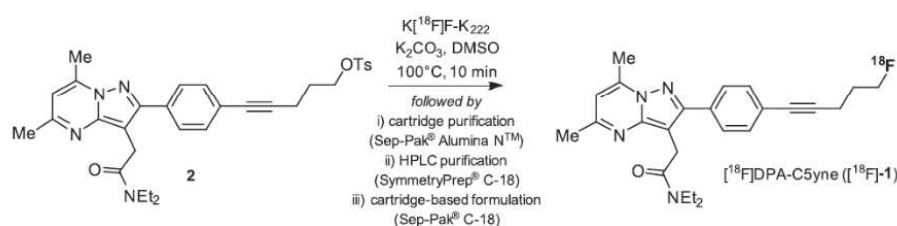


Figure 1. The TSPO radioligands [^{11}C]PK11195, [^{11}C]PBR28, [^{18}F]FEPPA, [^{11}C]DPA-713, [^{18}F]DPA-714 and [^{18}F]DPA-C5yne ([^{18}F]-**1**, present work).



Scheme 1. Synthesis of DPA-C5yne (1, reference compound) and its tosylated analogue (2) as labelling precursor.



Scheme 2. One-step radiosynthesis, purification and formulation of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-1).

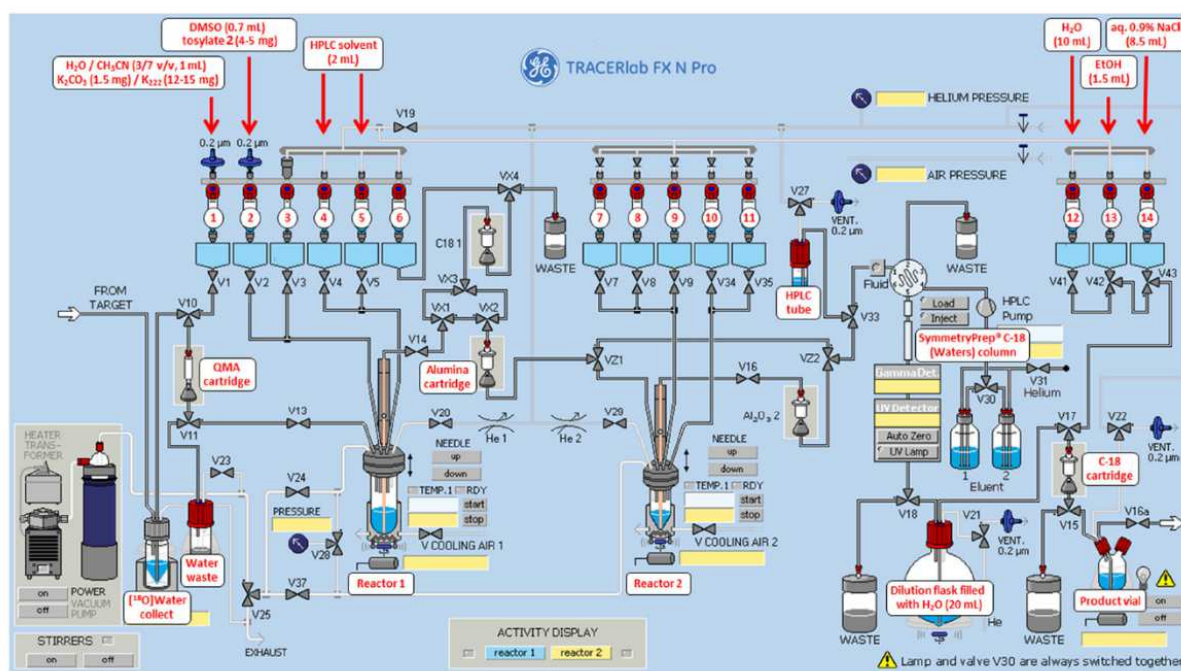


Figure 2. Description of the TRACERLab FX N Pro synthesizer used for the preparation of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-1) and positioning of all required reagents, solvents and consumables.

yields were rather low and not reproducible. Moreover, high chemical and radiochemical purities were not systematically reached based on Quality Control (QC) analysis. These behaviours were not observed during the preparation of [¹⁸F]DPA-714. Decreasing the reaction temperature together with

slightly extending the reaction time (100°C/10 min) provided [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-1) in higher and more reproducible yields without any QC issues.

The crude reaction mixture was then cooled down to 50°C before being diluted with the HPLC solvent used for the

purification and then passed through an Al₂O₃ cartridge (Sep-Pak® Alumina NTM cartridge, Waters (Guyancourt, France)) in order to remove (trap) unreacted [¹⁸F]fluoride. The left-over activity in the reactor was then rinsed once with a second portion of HPLC-solvent and passed through the cartridge too. The combined fractions were then purified by HPLC on a semipreparative SymmetryPrep® C-18 column (Waters), using a mixture of CH₃CN, H₂O and Trifluoroacetic acid (TFA) as the eluent (HPLC D, see Experimental Section). Using the latter conditions, [¹⁸F]-**1** (*t_R*: 9–10 min) could be obtained with a > 95% chemical and radiochemical purity and was completely separated from the remaining tosylate **2** (*t_R*: 15–17 min). Removal of the HPLC solvents and formulation of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) as an *i.v.* injectable solution (0.9% aq NaCl containing EtOH) were performed using a reverse phase cartridge (Sep-Pak® Plus C18 cartridge). The whole process, including radiofluorination, cartridge and HPLC purifications, as well as formulation, lasted between 37 and 42 min.

Typically, 4.3–5.2 GBq of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) ready-to-use was obtained with specific radioactivities ranging from 55 to 110 GBq/μmol within 50–60 min (HPLC purification and Sep-Pak®-based formulation included), starting from a 30 GBq [¹⁸F]fluoride batch. Overall, non-decay corrected, isolated yields were 14–17% (20–25% decay corrected).

Quality controls of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) were performed on an aliquot of the ready for *i.v.* injection batch. The prepared radiotracer solution was clear and colourless with a pH between 6 and 7. As demonstrated by analytical-HPLC control (HPLC E, see Experimental Section), the radiotracer preparation was found to be >95% chemically and radiochemically pure (**1**, *t_R*: 2.20 min). The preparation was also shown to be free of the non-radioactive precursor, the tosylate **2** (*t_R*: 3.51 min), and was chemically and radiochemically stable for at least 120 min.

Lipophilicities

LogP (*n*-octanol/water partition coefficient) and LogD (*n*-octanol/buffer pH 7.4 partition coefficient) of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) were measured using the shake-flask method, and values of 2.39 and 2.51 were found, respectively. The calculated LogP (cLogP) was determined using CHEMBIODRAW ULTRA SOFTWARE, and a value of 4.28 was found. These values were all slightly higher than the ones previously obtained for [¹⁸F]DPA-714 (LogP: 1.66, LogD: 1.74 and cLogP: 3.33) but remained in the recommended range for a radiotracer dedicated to brain imaging (1 < LogP/LogD < 3). As with DPA-714, cLogP value was much higher than LogP and LogD measurements.

In vitro stability in rat plasma

Stability of DPA-C5yne (**1**) was checked *in vitro* in rat spiked plasma at 37°C by LC-MS. Analyses of acetonitrile plasma extracts at different incubation time points (0, 5, 15, 60 and 90 min) showed only one single peak with a retention time (*t_R*: 12.9 min) and UV-spectrum (λ_{max} = 270 nm) identical to those of authentic DPA-C5yne. The variability in the peak area measurement as a function of time was less than 2%. Furthermore, for each time point, MS exhibited one molecular ion, at *m/z* 421 [M+H⁺], with a mass spectrum and a fragmentation profile also identical to those of authentic DPA-C5yne. Thus, DPA-C5yne (**1**) proved to be stable in plasma at 37°C for at least 90 min because no decomposition product could be observed.

Autoradiography studies

Autoradiography studies were performed on slices of our in-house-developed rat model of acute local neuroinflammation. This model is based on an excitotoxic AMPA-mediated brain lesion in the right striatum of Wistar rats. It has already been validated for TSPO expression by immunohistochemical analyses^{49–51} and used for the evaluation of several TSPO radioligands, such as [¹¹C]PK11195,^{49,50} [¹¹C]CLINME,^{50,52} [¹¹C]DPA-713,^{49,51} [¹⁸F]PBR111,⁵² [¹⁸F]DPA-714⁵¹ and more recently [¹¹C]SSR180575.⁵³ Briefly, brain slices were incubated with [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**, 7.4 nM) alone, and also coincubated with non-labelled DPA-C5yne (**1**, 20 μM), or PK11195 (20 μM, the TSPO ligand of reference) or Flumazenil (20 μM, a CBR ligand of reference), respectively, in order to confirm the selectivity and specificity of the binding. As shown in Figure 3(A), a significantly increased binding of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) was detected in the lesion when compared to the control side. The target-to-background ratio (TBR), calculated as the bound tracer in the lesion versus the bound tracer in the contralateral side, was relatively high, 1.9 ± 0.3 (*p* < 0.0001). Addition of an excess of unlabelled DPA-C5yne or PK11195 (20 μM, 2700-fold mass excess compared to [¹⁸F]DPA-C5yne) fully inhibited the binding (Figure 3(B) and 3(C)) in the lesioned area (TBR = 1.0 ± 0.1 for both ligands), proving a high specificity of the binding and selectivity for the TSPO. However, the addition of a similar excess of Flumazenil did not affect the binding of [¹⁸F]DPA-C5yne (Figure 3(D)), yielding a calculated TBR of 1.9 ± 0.1, a value identical to the one found for [¹⁸F]DPA-C5yne alone, proving its selectivity for the TSPO and not for the CBR.

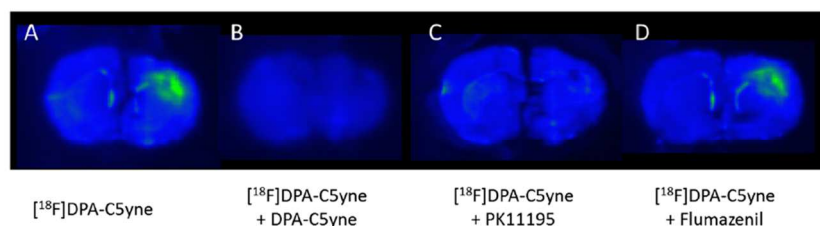


Figure 3. Autoradiography studies on slices of AMPA-lesioned rat brains incubated with [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**, 7.4 nM) alone (A) or with non-labelled DPA-C5yne (20 μM) (B), with PK11195 (20 μM) (C) and with Flumazenil (20 μM) (D), respectively.

Conclusions

The pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-acetamide [^{18}F]DPA-C5yne is a novel, fluorine-18-labelled, radioligand targeting the TSPO with promising *in vitro* properties. PET imaging studies are currently being carried out in both acute and chronic animal models of neurodegeneration in order to evaluate the *in vivo* potential of this DPA-714 analogue.

Experimental

General

Chemicals

Chemicals were purchased from Aldrich, Fluka, Sigma or Cooper (France) and were used without further purification, unless otherwise stated.

Thin-layer chromatography analysis and flash chromatography

Thin-layer chromatography was run on pre-coated plates of silica gel 60F₂₅₄ (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The compounds were localized when possible at 254 nm using a UV-lamp and/or by dipping the TLC-plates in a 1% ethanolic ninhydrin solution, a basic KMnO₄ aqueous solution or a 1% MeOH/H₂O (1/1, v/v) FeCl₃ solution and heating on a hot plate. Flash chromatographies were conducted on silica gel or alumina gel (0.63–0.200 mm, VWR) columns.

High-performance liquid chromatography analysis

[HPLC A]: Equipment: Waters (Guyancourt, France) system equipped with a 600E System Controller, a Prep LC 3000 pump, a 490E programmable multiwavelength UV-detector and a Kipp and Zonen (Emerainville, France) BD12E flatbed recorder; column: preparative Zorbax® RX-SIL, Hewlett Packard (Les Ulis, France) (250 × 21.2 mm); porosity: 5 µm; conditions: eluent: CH₂Cl₂/MeOH: 98.5/1.5 (v/v); flow rate: 10 mL/min; temperature: room temperature (RT); UV detection at λ: 230 nm. [HPLC B]: Equipment: Waters system equipped with a 510 pump and a Shimadzu SPD-10A UV-multiwavelength detector. Column: semipreparative SymmetryPrep® C-18, Waters (300 × 7.8 mm); porosity: 7 µm; conditions: eluent: CH₃CN/H₂O/TFA: 50/50/0.1 (v:v:v); flow rate: 5 mL/min; temperature: RT; UV detection at λ: 254 nm. [HPLC C]: Equipment: Waters system equipped with a 510 pump and a Shimadzu SPD-10A UV-multiwavelength detector. Column: semipreparative SymmetryPrep® C-18, Waters (300 × 7.8 mm); porosity: 7 µm; conditions: eluent: CH₃CN/H₂O/TFA: 60/40/0.1 (v:v:v); flow rate: 5 mL/min; temperature: RT; UV detection at λ: 254 nm. [HPLC D]: Equipment: TRACERLab FX N Pro (GE Medical Systems, Germany) integrated system, equipped with a Sykam S1122 Solvent Delivery System (pump), a Knauer K-2501 UV-multiwavelength detector and a miniaturized gamma-radioactivity detector. Column: semipreparative SymmetryPrep® C-18, Waters (300 × 7.8 mm); porosity: 7 µm; conditions: eluent: CH₃CN/H₂O/TFA: 60/40/0.1 (v:v:v); flow rate: 5 mL/min; temperature: RT; UV detection at λ: 254 nm. [HPLC E]: Equipment: Waters Alliance 2690 (or a Waters binary HPLC Pump 1525) equipped with a Waters 996 UV photodiode array detector and a Berthold LB509 radioactivity detector; column: analytical Symmetry-M® C-18, Waters (50 × 4.6 mm); porosity: 3.5 µm; conditions: eluent: solvA/solvB: 20/80 (v/v) [solvA: H₂O containing Low-UV PIC® B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL; solvB: H₂O/CH₃CN: 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC® B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL]; flow rate: 2.0 mL/min; temperature: 30°C (or RT); UV detection at λ: 280 nm.

Spectroscopies

Nuclear magnetic resonance spectra ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) were recorded on a Bruker (Wissembourg, France) Avance (400 MHz) apparatus using the hydrogenated residue of the deuterated solvent CDCl₃ (δ = 7.23 ppm) as internal standard for ^1H -NMR as well as the deuterated solvent CDCl₃ (δ = 77.0 ppm) as internal standard for ^{13}C -NMR. The chemical shifts are reported in parts per million, downfield from Tetramethylsilane (TMS)

(s, d, t, q, m, b for singlet, doublet, triplet, quadruplet, multiplet and broad, respectively). The MS were measured on a Thermo Scientific (Les Ulis, France) Ion Trap LCQ Deca XP + spectrometer (ESI+). The high resolution MS (HRMS) analyses were performed by Imagif (ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette, France) by electrospray with positive (ESI+) ionization mode on a Waters LCT Premier XE (Milford, MA, USA) spectrometer.

Radioisotope production

No-carrier-added fluorine-18 (half-life: 109.8 min) was produced via the [$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$] nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [^{18}O]water (>97%-enriched, Rotem (CortecNet, Paris, France)) target on an IBA Cyclone-18/9 (IBA, Louvain-la-Neuve, Belgium) cyclotron (18 MeV proton beam), and the aqueous radioactive solution was then transferred to the appropriate hot cell. Target hardware: commercial, 2-mL, two-port, stainless steel target holder equipped with a domed-end niobium cylinder insert. Target to hot cell liquid-transfer system: 50 m Polytetrafluoroethylene (PTFE) line (0.8 mm internal diameter; 1/16 inch external diameter), 2.0 bar helium drive pressure and transfer time 2–3 min. Typical production of [^{18}F]fluoride at the end of bombardment for a 25 µA, 30 min (12.5 µAh) irradiation: 31.5–32.5 GBq.

Acute neuroinflammatory animal model

Striatal AMPA-mediated excitotoxicity and acute local neuroinflammation was induced in the brain of Wistar rats according to reported procedures.^{49–51} The protocol used includes a stereotactic injection in the right striatum of 0.5 µL of AMPA ((*R,S*)-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionique, 15 mM in phosphate buffered saline buffer) in anaesthetized and normothermally controlled animals followed by a resting period of 7 days.

Chemistry

N,N-diethyl-2-(2-(4-(4-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (3)

Synthesized in five steps from commercially available methyl 4-iodobenzoate according to reference.⁴⁶ Rf (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v/v): 0.21. ^1H -NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.74 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 7.46 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 3.93 (s, 2H, CH₂), 3.81 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂OH), 3.49 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.40 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.74 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.55 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 1.86 (q⁵, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 1.22 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃). ^{13}C -NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 169.8 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.5 [C], 145.0 [C], 133.0 [C], 131.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 123.6 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 90.2 [C], 81.1 [C], 61.7 [CH₂], 42.2 [CH₂], 40.6 [CH₂], 31.3 [CH₂], 28.0 [CH₂], 24.5 [CH₃], 16.8 [CH₃], 16.0 [CH₂], 14.3 [CH₃], 13.0 [CH₃]. MS (ESI+): *m/z* 419 (M + H)⁺.

N,N-diethyl-2-(2-(4-(3-fluoropent-1-yn-1-yl)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl)acetamide (1, DPA-C5yne)

To a solution of compound **3** (84 mg, 0.201 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4 mL) was added a 50% Deoxofluor® solution in toluene (0.5 mL, excess). The reaction mixture was stirred for 3 days at RT, then diluted with MeOH (0.5 mL) and concentrated to dryness. Finally, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (heptane/acetone: 4/1 (v/v)) to afford **1** (20 mg, 24%) as a yellow solid. For analytical purposes only, compound **1** was further purified using preparative HPLC [HPLC A] and obtained, after solvents removal, as a light yellow solid. Rf (heptane/acetone: 1/1 (v/v)): 0.35. *t*_R: 30 min [HPLC A], 10.5 min [HPLC B], 9.5 min [HPLC C], 9.5 min [HPLC D] and 2.20 min [HPLC E]. ^1H -NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.76 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 7.47 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ph), 6.54 (s, 1H), 4.62 (dt, 2H, *J*_{H-F} = 47.2 Hz, *J*_{H-H} = 6.0 Hz, CH₂F), 3.97 (s, 2H, CH₂), 3.50 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.41 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 2.76 (s, 3H, CH₃), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.01 (dq⁵, 2H, *J*_{H-F} = 25.6 Hz, *J*_{H-H} = 6.0 Hz, CH₂), 1.23 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.12 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, NCH₂CH₃). ^{13}C -NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.5 [C], 147.4 [C], 145.2 [C], 133.0 [C], 131.6 [2xCH], 128.4 [2xCH], 123.5 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 89.3 [C], 82.5 [d, *J*_{C-F} = 164 Hz, CH₂], 81.2 [C], 42.2 [CH₂], 40.6 [CH₂], 29.5 [d, *J*_{C-F} = 20 Hz

CH₂], 28.0 [CH₂], 24.3 [CH₃], 16.9 [CH₃], 15.4 [d, $J_{\text{C-F}}^3 = 4 \text{ Hz}$, CH₂], 14.3 [CH₃], 13.0 [CH₃]. MS (ESI+): m/z : 421 (M + H)⁺. HRMS (m/z , ESI) calculated for C₂₅H₃₀FN₄O (M + 1), 421.2404; found, 421.2404.

6-(4-(3-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2-yl)phenyl)pent-4-yn-1-yl)4-methylbenzenesulfonate (2)

To a solution of compound **3** (200 mg, 0.478 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added Et₃N (80 μ L, 0.578 mmol, 1.2 eq) and DMAP (6 mg, 0.049 mmol, 0.1 eq). The flask was degassed and flushed with argon (two cycles), then cooled to 0°C. 4-toluenesulfonic anhydride (170 mg, 0.521 mmol, 1.1 eq) was slowly added to the previous solution, and the reaction mixture stirred at 0°C for 15 min, then at RT overnight. 4-toluenesulfonic anhydride (50 mg, 0.153 mmol, 0.3 eq) and Et₃N (100 μ L, 0.71 mmol, 1.5 eq) were added once again, and the mixture stirred another 2 days at RT. The reaction mixture was then evaporated under reduced pressure, and the resulting brownish oil was portioned between EtOAc (20 mL) and aq. 0.05 M HCl (15 mL). The organic layer was separated, washed with water (10 mL), brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness. Finally, the resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel (pure CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH: 98/2 (v/v)) to afford **2** (145 mg, 54%) as a light yellow solid. Rf (CH₂Cl₂/MeOH: 93/7 v/v): 0.58. t_R : 21.5 min [HPLC B], 15.5 min [HPLC C], 15.3–15.9 min [HPLC D], 3.51 min [HPLC E]. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.80 (d, 2H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, Ph), 7.76 (d, 2H, $J = 8.4 \text{ Hz}$, Ph), 7.36 (d, 2H, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 7.31 (d, 2H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, Ph), 6.53 (s, 1H), 4.21 (t, 2H, $J = 5.6 \text{ Hz}$, CH₂OTs), 3.94 (s, 2H, CH₂), 3.51 (q, 2H, $J = 7.2 \text{ Hz}$, NCH₂CH₃), 3.40 (q, 2H, $J = 7.2 \text{ Hz}$, NCH₂CH₃), 2.74 (s, 3H, CH₃), 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.49 (t, 2H, $J = 6.8 \text{ Hz}$, CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.94 (q⁵, 2H, $J = 6.8 \text{ Hz}$, CH₂), 1.23 (t, 3H, $J = 7.2 \text{ Hz}$, NCH₂CH₃), 1.11 (t, 3H, $J = 7.2 \text{ Hz}$, NCH₂CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 169.7 [C], 157.6 [C], 154.4 [C], 147.0 [C], 145.0 [C], 144.8 [C], 133.1 [C], 132.8 [C], 131.6 [2xCH], 129.8 [2xCH], 128.4 [2xCH], 127.8 [2xCH], 123.3 [C], 108.4 [CH], 101.3 [C], 88.4 [C], 81.7 [C], 68.9 [CH₂], 42.2 [CH₂], 40.6 [CH₂], 28.0 [CH₂], 27.9 [CH₂], 24.3 [CH₃], 21.6 [CH₃], 16.8 [CH₃], 15.7 [CH₂], 14.3 [CH₃], 13.0 [CH₃]. MS (ESI+): m/z : 573 (M + H)⁺. HRMS (m/z , ESI) calculated for C₃₂H₃₇N₄O₄S (M + 1), 573.2536; found, 573.2524.

Radiochemistry

The TRACERLab FX N Pro synthesizer: description, configuration, preparation and sequences used

Synthesizer description and sequences used

Fluorine-18 labelling, purification with HPLC and formulation of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) as an i.v. injectable solution was performed using a commercially available TRACERLab FX N Pro synthesizer (GE Medical Systems, Germany), placed in a 5.0-cm-lead shielded and ventilated cell. The whole process was thus fully automated and used a dedicated method supported by three generic 'time list', written according to the programming mode of General Electric synthesis modules, and named, respectively, 'Time list 1: K[¹⁸F]F-K₂₂₂ preparation', 'Time list 2: radiofluorination and pre-purification' and 'Time list 3: purification and formulation'.¹² Before each [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) batch production, the synthesizer was cleaned out (e.g. used-cartridge removal), purged from any residual chemicals or solvents left-over (reservoirs, reactors and tubings) from a previous radiotracer production and dried using another in-house programmed method, based on the use of two generic 'time list', named, respectively, 'Time list: clean' and 'Time list: clean and dry'.¹² The first cleaning procedure used deionized water to rinse both reactors [Reactor 1–2], the flask collecting the oxygen-18-enriched water [Water collect] and the tube dedicated to the HPLC injection [HPLC tube] and most of the connecting tubings. The second procedure used both

acetone and ethanol to further clean the synthesizer but also to dry all reservoirs [Reservoir 1–14], both reactors [Reactor 1–2], the tube dedicated to the HPLC injection [HPLC tube], the flask allowing the dilution of the HPLC-collected fraction prior to cartridge formulation [Dilution flask] and the flask required for receiving at last the batch of formulated product [Product vial] as well as all tubings connecting these elements.

Synthesizer configuration

Valves VZ1 and VZ2 were both turned in up-position for the preparation of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**), therefore by-passing most of the added functionalities of the TRACERLab FX N Pro synthesizer when compared to the TRACERLab FX FN one (e.g. the second reactor [Reactor 2] and its connected reservoirs [Reservoir 7–11] and associated tubings). Note that valves VX3 and VX4 as well as the associated option of using an additional cartridge purification unit were also not requested for this process.

Synthesizer preparation

Prior to [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) production, the following reservoirs and vessels were filled with the solutions described here: [Reservoir 1]: a mixture of deionized water and acetonitrile (30/70 v/v, 1 mL) containing 1.5 mg of K₂CO₃ and 12–15 mg of Kryptofix® 222; [Reservoir 3]: a DMSO solution (0.7 mL) containing the tosylate **2** (4.0–5.0 mg, 7.0–8.7 μ mol), as the labelling precursor; [Reservoir 4]: HPLC solvent (2 mL, see [HPLC D]); [Reservoir 5]: HPLC solvent (2 mL, see [HPLC D]); [Reservoir 12]: deionized water (10 mL); [Reservoir 13]: ethanol (1.5 mL); [Reservoir 14]: aq. 0.9% NaCl (8.5 mL); [Dilution flask]: deionized water (20 mL). Note that [Reservoir 2], [Reservoir 6], [Reservoir 7–11], [Reactor 1], [Reactor 2], [Product vial], [HPLC tube], [¹⁸O] Water collect, [Water waste] and all other [WASTE] were left empty. Additionally, all cartridges requested for the preparation of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) were, before being mounted on the synthesizer, conditioned as described here: [QMA cartridge]: Sep-Pak® Light Accell™ Plus QMA cartridge (Waters), hydroxide form, generated from the chloride form by washing with aq. 1 M NaHCO₃ (2 mL) and rinsed with deionized water (20 mL) and CH₃CN (10 mL); [Alumina N cartridge]: Sep-Pak® Alumina N™ cartridge (Waters), washed with deionized water (10 mL); [C-18 cartridge]: Sep-Pak® Plus C18 cartridge (Waters), washed with EtOH (2 mL) and then rinsed with deionized water (10 mL). Finally, the HPLC-column and system was also conditioned with the appropriate solvent (see [HPLC D]), and DPA-C5yne (**1**), as standard, was injected once.

Radiosynthesis, purification and formulation of [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**)

K[¹⁸F]F-K₂₂₂ preparation (Time list 1)

The target content (oxygen-18-enriched water containing [¹⁸F] fluorine-18) was transferred to the TRACERLab FX N Pro synthesizer using helium pressure (2 bars) and was first collected in the [¹⁸O]-water collect vial, then sucked through the [QMA cartridge]. At this stage, fluorine-18 was trapped, as [¹⁸F]fluoride, in the cartridge, and the oxygen-18-enriched water was collected in the [Water waste] vial. [¹⁸F]fluoride anions were then released from the cartridge using the solution stored in [Reservoir 1] and eluted into [Reactor 1]. The mixture was gently concentrated to dryness using the following two heating steps sequentially: (i) 60°C, 7 min at a pressure between 30 and

35 kPa, then (ii) 120°C, 5 min under vacuum. Additional dilution with CH₃CN followed by azeotropic distillation was not performed. The expected K[¹⁸F]F-K₂₂₂ complex, ready for the fluorination step, was obtained within 18 min.

Fluorine-18 incorporation and pre-purification (Time list 2)

The content of the [Reservoir 3] (e.g. 4–5 mg of **2** as precursor for labelling in solution in 700 µL of DMSO) was added to the [Reactor 1] (the latter containing the aforementioned K[¹⁸F]F-K₂₂₂ complex). The [Reactor 1] was then heated at 100°C for 10 min and then cooled down to 50°C. The content of [Reservoir 4] (HPLC solvent, 2 mL) was added to the [Reactor 1]. The diluted content of [Reactor 1] was then transferred under pressure through the [Alumina cartridge] and collected in the [HPLC tube]. The content of [Reservoir 5] (HPLC solvent, 2 mL) was further added to the [Reactor 1] and the novel content of [Reactor 1] was then analogously transferred (under pressure) through the [Alumina cartridge] and collected in the [HPLC tube] too. The part of the process described here lasted about 17 min.

High-performance liquid chromatography purification and formulation (Time list 3)

The cartridge-purified solution (about 4.7 mL) collected in the [HPLC tube] was transferred under pressure into the HPLC injection loop (5 mL). HPLC purification started at the signal given by the fluid detector, the latter switching the loop-valve from the 'load' position to the 'inject' position. HPLC elution was followed by both UV (254 nm) and radioactivity detection. The fraction containing [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) was collected separately, on the operator's actions (clicking on the start-collect and end-collect icons), in the [Dilution flask], prefilled with water (20 mL). Final formulation of the radiotracer was performed automatically using a Sep-Pak® Plus C18-based system. For this, the content of the [Dilution flask] was first passed through the [C-18 cartridge] (trapping the radiotracer), the latter being then washed with water (10 mL, stored in the [Reservoir 12]). Elution of the cartridge with EtOH (1.5 mL, stored in the [Reservoir 13]) afforded [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**), which was recovered in the [Product flask]. Addition of 0.9% aq NaCl (8.5 mL, stored in the [Reservoir 14]) through the [C-18 cartridge] was performed at last to complete the formulation step. HPLC purification and formulation steps lasted about 20–25 min.

Quality control of formulated [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**)

Appearance test

The radiotracer preparation was visually inspected behind a lead-shielded glass window for clarity and absence of particulates.

pH test

The pH was determined using standard pH paper using an aliquot of the radiotracer preparation.

Identification and chemical and radiochemical purity test

Identification as well as chemical and radiochemical purity determinations were assessed by separate analytical-HPLC analysis, using a sample of authentic **1** as standard (particular attention was paid to the absence of non-radioactive precursor **2** (tosyloxy derivative)). For this, an aliquot of the radiotracer

preparation (5–20 µL) was injected onto HPLC [HPLC E]. The chemical identity was determined by UV-spectrometric analysis, by comparison of the UV-profile, λ_{max} and retention time recorded with those observed for the corresponding reference compound (**1**) in the same HPLC system and conditions. Chemical purity was also assessed on the UV-chromatogram based on the relative integration of the peak areas. Radiochemical identity was also confirmed by combined radioactive and UV-spectrometric analysis, by comparison of the retention time of the radioactive compound with the corresponding non-radioactive reference compound (**1**). Radiochemical purity was assessed on the radioactive chromatogram based on the relative integration of the peak area corresponding to the radiotracer.

Specific radioactivity determination

Specific radioactivity of the radiotracer was calculated from three consecutive HPLC analyses. For this, an aliquot of the radiotracer preparation (5–20 µL) was injected onto HPLC [HPLC E], and for each injection, the area of the UV absorbance peak corresponding to the product was measured (integrated) on the HPLC chromatogram and compared to a standard curve relating mass to UV absorbance, allowing the determination of the corresponding mass. The HPLC fraction corresponding to the peak was also collected in a vial, and its radioactivity measured in an ionization chamber (Capintec, Ramsey, NJ, USA). The specific radioactivity, as a mean of three independent experiments, was calculated by dividing the counted radioactivity by the found mass (triplicate).

On-shelf stability test

Chemical and radiochemical stability of the entire preparation was checked by HPLC. For this, aliquots of the radiotracer preparation (20 µL) were injected onto HPLC [HPLC E] at regular 15-min intervals during 120 min. For each injection, the chemical and radiochemical purity was determined (see in the preceding text). Moreover, for each injection, the mass associated to the peak corresponding to the product was calculated (using the standard curve relating mass to UV absorbance), and its radioactivity was also measured, before being then corrected for the decay of fluorine-18. Values of both mass and decay-corrected radioactivity per sample were plotted against time and fitted for linearity.

Lipophilicity determination

LogP (*n*-octanol/water partition coefficient)

[¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**, 1–5 kBq in 50 µL of water) was added to a two-layer system of *n*-octanol (500 µL) and water (450 µL) in an Eppendorf cap (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The vessel was strongly vortexed for 3 min and then centrifuged at 3000 rpm for 2 min. An aliquot of each layer (100 µL) was assessed for radioactivity in a cross-calibrated Perkin-Elmer Cobra Quantum γ-counter (Les Ulis, France).

LogD (*n*-octanol/buffer pH 7.4 partition coefficient)

The procedure described earlier was repeated by replacing water by 0.1 M phosphate buffered saline pH 7.4 (450 µL). The partition coefficients (LogP and LogD) were calculated as the decimal logarithm of the ratio between the counted radioactivity in the *n*-octanol phase and the counted radioactivity in the aqueous phase.

CLogP (calculated LogP)

CLogP values were determined using CHEMBIODRAW ULTRA 11.0.1 software (Cambridge Soft., Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

In vitro stability in rat plasma**Sample preparation**

Rat plasma (4 mL, prepared from whole blood by centrifugation (5 min, 3000 g and at 4°C)) was spiked with 40 µL of a 10 mM DPA-C5yne (1) solution in CH₃CN (final concentration: 100 µM, maximum 1% of organic solvent). Two samples of 200 µL were first removed, and an equal volume of CH₃CN (200 µL) was added. For each sample, the mixture was centrifuged (4°C, 3500 rpm, 5 min) and the supernatant was collected. 20 µL of each extract were then injected onto the LC-MS system, and the peak area corresponding to DPA-C5yne was measured (time zero). The remainder of the spiked plasma was then incubated at 37°C for 5, 15, 30, 60 and 90 min. For each time point, two samples were removed and processed as indicated earlier.

LC-MS analyses

Liquid chromatography-mass spectrometry analyses were performed using an Ion Trap LCQ Deca XP+ mass spectrophotometer equipped with an electrospray source (Thermo Scientific, Les Ulis, France). Pressurized nitrogen was used as sheath gas with a flow rate of 25 units (arbitrary units for sheath gas pressure as defined by the manufacturer). The source voltage for ESI was 4.5 kV and the capillary voltage was 38 V. The capillary temperature was 275°C. The HPLC system (Thermo Scientific) interfaced with the mass spectrophotometer consisted of a Surveyor pump (54949 series), a Surveyor autosampler (55989 series), a photodiode array detector (56470 series) and an analytical Atlantis C18 (Waters) column (2.1 × 150 mm, porosity 5 µm). The mobile phase consisted of A: H₂O containing 0.05% formic acid and B: CH₃CN containing 0.05% formic acid. A linear gradient from 40 to 80% of B in 10 min was applied to the column at a flow rate of 200 µL/min and returns to the initial conditions within 5 min. The whole output of the LC column was passed through the photodiode array detector (190–600 nm) before ESI probe of the mass spectrometer (operated in the positive mode). In the full scan MS acquisition mode, the instrument method was set up to detect ions in the range of *m/z* 50–500. Data acquisition and processing were performed with XCALIBUR™ software (version 2.0, Thermo Scientific, Les Ulis, France). The peak area corresponding to DPA-C5yne (1) was measured as a function of the incubation time.

Brain autoradiography studies with [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-1)

Brain slices of unilaterally AMPA-lesioned animals were prepared according to reported procedures.^{49–51} The protocol used includes the decapitation of the animals under terminal anaesthesia, quick brain removal and freezing in cold (–80°C, dry-ice) isopentane followed by coronally, 10 µm thick slicing of the brain at the level of the lesion. Then, adjacent brain slices (36 slices from the centre of the lesioned area) were taken and incubated for 20 min in Tris Buffer (TRIZMA pre-set Crystals, Sigma®, adjusted at pH 7.4 at 4°C, 50 mM with NaCl 120 mM) containing [¹⁸F]DPA-C5yne (111 MBq, 75 GBq/µmol, 555 MBq/L, 7.4 nM) alone, or [¹⁸F]DPA-C5yne and PK11195 (20 µM), [¹⁸F]

DPA-C5yne and DPA-C5yne (20 µM) as well as [¹⁸F]DPA-C5yne and Flumazenil (20 µM). Brain sections were then washed two times for 2 min and once for 10 s with cold (4°C) buffer, then exposed on a Phosphor-Imager (Storm 860, Molecular Dynamics, Pharmacia, GE Medical systems, Germany) screen overnight. Autoradiograms were scanned and then analysed using the IMAGEJ software (developed by the National Institutes of Health). A region of interest was manually drawn around the core of the lesion, and an identical area was copy-pasted symmetrically into the contralateral hemisphere. Binding in the region of interest was then expressed as the number of counts per surface unit. The TBR was calculated as the ratio of the binding in the lesioned versus the contralateral hemisphere.

Acknowledgements

The authors wish to thank the cyclotron operators Mr Daniel Gouel, Mr Christophe Lechène and Mr Tony Catarina for performing the irradiations. This work was supported by the CEA-I²BM intramural programmes, as well as the European Union's Seventh Framework Programme [FP7/2007–2013] INMiND (Grant agreement no HEALTH-F2-2011-278850). PhD students Vincent Médran-Navarrete and Nicholas Bernards were in part supported by a CEA Irtelis doctoral grant and the EU FP7 INMiND programme (see in the preceding text), respectively.

References

- [1] V. Papadopoulos, M. Baraldi, T. R. Guilarte, T. B. Knudsen, J. J. Lacapere, P. Lindemann, M. D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M. R. Zhang, M. Gavish, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 402–409.
- [2] R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, T. C. Baghai, J. Fan, N. Akula, G. Groyer, D. Adams, M. Schumacher, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 971.
- [3] A. M. Scarf, M. Kassiou, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 677.
- [4] F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, F. Dollé, B. Tavitian, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 2304.
- [5] F. Dollé, C. Luus, A. Reynolds, M. Kassiou, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2899.
- [6] C. Luus, R. Hanani, A. Reynolds, M. Kassiou, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 501.
- [7] D. Roeda, B. Kuhnast, A. Damont, F. Dollé, *J. Fluor. Chem.* **2012**, *134*, 107.
- [8] A. S. C. Ching, B. Kuhnast, A. Damont, D. Roeda, B. Tavitian, F. Dollé, *Insights into Imaging* **2012**, *3*, 111.
- [9] A. Damont, D. Roeda, F. Dollé, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*, 96.
- [10] M. L. James, R. R. Fulton, J. Vercouillie, D. J. Henderson, L. Garreau, S. Chalou, F. Dollé, B. Costa, D. Guilloteau, M. Kassiou, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 814.
- [11] A. Damont, F. Hinnen, B. Kuhnast, M.-A. Schöllhorn-Peyronneau, M. L. James, C. Luus, B. Tavitian, M. Kassiou, F. Dollé, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 286.
- [12] B. Kuhnast, A. Damont, F. Hinnen, T. Catarina, S. Demphel, S. Le Helleix, C. Coulon, S. Goutal, P. Gervais, F. Dollé, *Appl. Rad. Isot.* **2012**, *70*, 489.
- [13] C. Fookes, T. Pham, F. Mattner, I. Greguric, C. Loc'h, X. Liu, P. Berghofer, R. Shepherd, M.-C. Grégoire, A. Katsifis, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3700.
- [14] A. Martin, R. Boisgard, B. Thézé, N. Van Camp, B. Kuhnast, A. Damont, M. Kassiou, F. Dollé, B. Tavitian, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 230.
- [15] A. Martin, R. Boisgard, M. Kassiou, F. Dollé, B. Tavitian, *Mol. Imag. Biol.* **2011**, *13*, 10.
- [16] J. Zheng, R. Boisgard, K. Siquier-Pemet, D. Decaudin, F. Dollé, B. Tavitian, *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 823.
- [17] A. Winkler, R. Boisgard, A. R. Awde, A. Dubois, B. Thézé, J. Zheng, L. Ciobanu, F. Dollé, T. Viel, A. H. Jacobs, B. Tavitian, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 811.
- [18] D. Tang, M. R. Hight, E. T. McKinley, A. Fu, J. R. Buck, R. A. Smith, M. N. Tantawy, T. E. Peterson, D. C. Colvin, M. S. Ansari, M. Nickels, H. C. Manning, *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 287.
- [19] N. Arlicot, J. Vercouillie, M.-J. Ribeiro, C. Tauber, Y. Venel, J.-L. Baulieu, S. Maia, P. Corcia, M. G. Stabin, A. Reynolds, M. Kassiou, D. Guilloteau, *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39*, 570.

- [20] G. Abourbeh, B. Thézé, R. Maroy, A. Dubois, V. Brulon, Y. Fontyn, F. Dollé, B. Tavitian, R. Boisgard, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 5728.
- [21] S. Lavis, M. Guillermier, A. S. Héard, F. Petit, M. Delahaye, N. Van Camp, L. Ben Haim, V. Lebon, P. Remy, F. Dollé, T. Delzescaux, G. Bonvento, P. Hantraye, C. Escartin, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 10809.
- [22] P. Corcia, C. Tauber, J. Vercoullie, N. Arlicot, C. Prunier, J. Praline, G. Nicolas, Y. Venel, C. Hommet, J.-L. Baulieu, J. P. Cottier, C. Roussel, M. Kassiou, D. Guilloteau, M.-J. Ribeiro, *PLoS One* **2012**, *7*, e52941.
- [23] H. Boutin, C. Prenant, R. Maroy, J. Galea, A. D. Greenhalgh, A. Smigova, C. Cawthorne, P. Julyan, S. M. Wilkinson, S. D. Banister, G. Brown, K. Herholz, M. Kassiou, N. J. Rothwell, *PLoS One* **2013**, *8*, e56441.
- [24] R. Camsonne, C. Crouzel, D. Comar, M. Mazière, C. Prenant, J. Sastre, M. A. Moulin, A. Syrota, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1984**, *21*, 985.
- [25] R. B. Banati, J. Newcombe, R. N. Gunn, A. Cagnin, F. Turkheimer, F. Heppner, G. Price, F. Wegner, G. Giovannoni, D. H. Miller, D. G. Perkin, T. Smith, A. K. Hewson, G. Bydder, G. W. Kreutzberg, T. Jones, M. L. Cuzner, R. Myers, *Brain* **2000**, *123*, 2321.
- [26] E. Briard, J. L. Hong, J. L. Musachio, S. S. Zoghbi, M. Fujita, M. Imaizumi, V. Cropley, R. B. Innis, V. W. Pike, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2005**, *48*, 571.
- [27] M. Imaizumi, H. J. Kim, S. S. Zoghbi, E. Briard, J. Hong, J. L. Musachio, C. Ruetzler, D. M. Chuang, V. W. Pike, R. B. Innis, M. Fujita, *Neurosci. Lett.* **2007**, *411*, 200–205.
- [28] A. K. Brown, M. Fujita, Y. Fujimura, J.-S. Liow, M. Stabin, Y. H. Ryu, M. Imaizumi, J. Hong, V. W. Pike, R. B. Innis, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 2072–2079.
- [29] E. Briard, S. S. Zoghbi, M. Imaizumi, J. P. Gourley, H. U. Shetty, J. Hong, V. Cropley, M. Fujita, R. B. Innis, V. W. Pike, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 17–30.
- [30] M. Imaizumi, E. Briard, S. S. Zoghbi, J. P. Gourley, J. Hong, I. Fujimura, V. W. Pike, R. B. Innis, M. Fujita, *Neuroimage* **2008**, *39*, 1289–1298.
- [31] M. Fujita, M. Imaizumi, S. S. Zoghbi, Y. Fujimura, A. G. Farris, T. Suhara, J. Hong, V. W. Pike, R. B. Innis, *Neuroimage* **2008**, *40*, 43–52.
- [32] W. C. Kreisl, M. Fujita, Y. Fujimura, N. Kimura, K. J. Jenko, P. Kannan, J. Hong, C. L. Morse, S. S. Zoghbi, R. L. Gladding, S. Jacobson, U. Oh, V. W. Pike, R. B. Innis, *Neuroimage* **2010**, *49*, 2924–2932.
- [33] A. A. Wilson, A. Garcia, J. Parkes, P. McCormick, K. A. Stephenson, S. Houle, N. Vasdev, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 305–314.
- [34] R. Mizrahi, P. M. Rusjan, I. Vitcu, A. Ng, A. A. Wilson, S. Houle, P. M. Bloomfield, *Mol. Imaging Biol.* **2013**, *15*, 353.
- [35] D. R. Owen, O. W. Howell, S. P. Tang, L. A. Wells, I. Bennacef, M. Bergström, R. N. Gunn, E. A. Rabiner, M. R. Wilkins, R. Reynolds, P. M. Matthews, C. A. Parker, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 1608–1618.
- [36] D. R. Owen, R. N. Gunn, E. A. Rabiner, I. Bennacef, M. Fujita, W. C. Kreisl, R. B. Innis, V. W. Pike, R. Reynolds, P. M. Matthews, C. A. Parker, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 24–32.
- [37] D. R. Owen, A. J. Yeo, R. N. Gunn, K. Song, G. Wadsworth, A. Lewis, C. Rhodes, D. J. Pulford, I. Bennacef, C. A. Parker, P. L. StJean, L. R. Cardon, V. E. Mooser, P. M. Matthews, E. A. Rabiner, J. P. Rubio, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32*, 1–5.
- [38] M. A. Peyronneau, W. Saba, S. Goutal, A. Damont, F. Dollé, M. Kassiou, M. Bottlaender, H. Valette, *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 122.
- [39] J. Marić, A. Ogasawara, B. Martin-McNulty, J. Ross, J. E. Flores, H. S. Gill, J. N. Tinianow, A. N. Vanderbilt, M. Nishimura, F. Peale, C. Pastuskovas, J. M. Greve, N. van Bruggen, S. P. Williams, *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 982–990.
- [40] S. S. Zoghbi, H. U. Shetty, M. Ichise, M. Fujita, M. Imaizumi, J. S. Liow, J. Shah, J. L. Musachio, V. W. Pike, R. B. Innis, *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 520–527.
- [41] M. A. Peyronneau, W. Saba, F. Dollé, S. Goutal, C. Coulon, M. Bottlaender, H. Valette, *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39*, 347–359. Difficulties in dopamine transporter radioligand PET analysis: the example of LBT-999 using [18F] and [11C] labelling: part II: Metabolism studies.
- [42] B. Teclé, J. E. Casida, *Chem. Res. Toxicol.* **1989**, *2*, 429–435.
- [43] D. E. Ponde, C. S. Dence, N. Oyama, J. Kim, Y. C. Tai, R. Laforest, B. A. Siegel, M. J. Welch, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 420–428.
- [44] R. Nishii, W. Tong, R. Wendt, S. Soghomonyan, U. Mukhopadhyay, J. Balatoni, O. Mawlawi, L. Bidaut, P. Tinkey, A. Borne, M. Alauddin, C. Gonzalez-Lepera, B. Yang, J. G. Gelovani, *Mol. Imaging Biol.* **2012**, *14*, 231–224.
- [45] V. W. Pike, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 431–440.
- [46] V. Médran-Navarrete, A. Damont, M.-A. Peyronneau, B. Kuhnast, N. Bernards, G. Pottier, F. Marguet, F. Puech, R. Boisgard, F. Dollé, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 1550–1556.
- [47] H. H. Coenen, B. Klatte, A. Knoechel, M. Schueller, G. Stöcklin, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1986**, *23*, 455.
- [48] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 235.
- [49] H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominiaux, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, M. L. James, S. Jan, V. Brulon, Y. Fontyn, R. Trébossen, P. Hantraye, F. Dollé, B. Tavitian, M. Kassiou, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 573.
- [50] H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominiaux, B. Kuhnast, M.-C. Grégoire, S. Jan, V. Brulon, Y. Fontyn, R. Trébossen, P. Hantraye, F. Dollé, B. Tavitian, A. Katsifis, *Glia* **2007**, *55*, 1459.
- [51] F. Chauveau, N. Van Camp, F. Dollé, B. Kuhnast, F. Hinnen, A. Damont, H. Boutin, M. L. James, M. Kassiou, B. Tavitian, *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 468.
- [52] N. Van Camp, R. Boisgard, B. Kuhnast, B. Thézé, T. Viel, M.-C. Grégoire, F. Chauveau, H. Boutin, A. Katsifis, F. Dollé, B. Tavitian, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 962.
- [53] F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, C. Thominiaux, P. Hantraye, L. Rivron, F. Marguet, M.-N. Castel, T. Rooney, J. Benavides, F. Dollé, B. Tavitian, *J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 509.

Acte de congrès n°1 : « International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences - 2011 »

19th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences S461

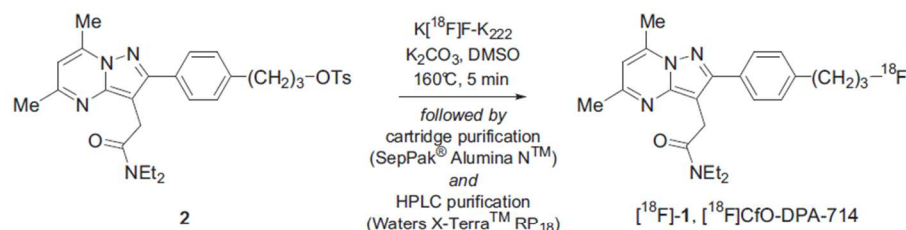
P-372 Synthesis and fluorine-18 labelling of a novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidineacetamide, CfO-DPA-714, a compound devoid of the metabolically unstable fluoroalkoxy moiety

Damont Annelaure¹, Sik-chung Alex Ching¹, Medrán-Navarrete Vincent¹, Kuhnast Bertrand¹, Gaudy Hélène¹, Dollé Frédéric¹

¹ CEA, I2BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay, France

Objectives: Nearly all brain diseases reveal pronounced changes in the functional states of glial cells and most prominent is the presence of activated microglia in areas of progressive disease or tissue destruction. Microglia activation is characterized by the over-expression of the translocator protein 18 kDa (TSPO) on the outer mitochondrial membranes, supporting for over two decades considerable efforts in the design of radioligands for the *in vivo* imaging of this pharmacological target by Positron Emission Tomography [1]. A particular attractive and today well-recognized chemical family of selective TSPO radioligands are the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidineacetamides, a series that includes the fluoroethoxy derivative [¹⁸F]DPA-714. However, recent studies clearly demonstrated that this compound is rapidly and extensively *in vivo* metabolized in both rodents (rats) and non-human primates (baboons), with notably formation of fluorine-18-labelled metabolites resulting from *O*-dealkylation [2]. Based on these observations, a novel series of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidineacetamides were designed by replacing the oxygen atom bridging the phenyl ring and the fluoroalkyl chain by a methylene group.

Methods: CfO-DPA-714 (1) as reference compound as well as its tosylated derivative 2 as precursor for labelling with fluorine-18 were synthesized in nine steps from commercially available methyl 4-hydroxybenzoate. The key-intermediate was the corresponding propylalcohol derivative, which was reacted at the last stage, in dichloromethane, either with DeoxoFluor to afford CfO-DPA-714 (1) or with TsCl and triethylamine to afford the tosylate 2. Fluorine-18 labelling of CfO-DPA-714 (1) was performed using a TRACERLab FX-FN synthesizer (GEMS) and comprises (1) dissolution of the no-carrier-added, dried (activated) K[¹⁸F]F-Kryptofix[®]222 complex (prepared from cyclotron-produced [¹⁸F]fluoride, potassium carbonate and Kryptofix[®]222) in DMSO (700 µL) containing 4.0 to 4.5 mg of the tosylate 2 (7.2 to 9.8 µmol); (2) heating the reaction mixture at 160°C for 5 minutes; (3) dilution of the reaction mixture with twice 2 mL of the HPLC mobile phase; (4) pre-purification on a SepPak[®] Alumina NTM cartridge; (5) HPLC purification on a semi-preparative X-TerraTM RP₁₈ column (eluent : aq. NH₄OAc 0.1 M pH10 / MeCN : 60/40 (v:v)) and (6) SepPak[®] cartridge-based removal of the HPLC solvents and formulation for *i.v.* injection.



Results: CfO-DPA-714 (1) and its tosylated analogue 2 were obtained in 52% and 85% yields respectively from the common propylalcohol intermediate. [¹⁸F]CfO-DPA-714 ([¹⁸F]-1) was obtained in 25-30% non decay-corrected yields, based on starting [¹⁸F]fluoride. Typically, starting from a 30 GBq cyclotron-produced [¹⁸F]fluoride batch, 7.5 to 9.0 GBq of [¹⁸F]-1, > 99% radiochemically pure and ready-to-inject, were obtained in 55-60 min (including HPLC-purification, R_t : 11 min) and with specific radioactivities ranging from 50 to 90 GBq/µmol.

Conclusions: CfO-DPA-714 (1), a first candidate of a novel series of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidineacetamides, putatively less prone to metabolism and in particular more stable with regard to radiodefluorination, was successfully synthesized and labelled with fluorine-18. Comparative PET-imaging (Focus 220 Concorde) is currently underway in a rat model of neuroinflammation (unilaterally, AMPA-induced, striatum-lesioned rats) to demonstrate its potential to image the TSPO.

Research support: CEA-I2BM intramural research programs.

References: [1] Dollé et al. (2009), *Curr. Med. Chem.*, 16, 2899-2923 ; [2] Peyronneau et al. (2009), *J. Label. Compds Radiopharm.*, 52 (suppl 1), S385

Acte de congrès n°2 : « International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences - 2013 »

S294 20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences

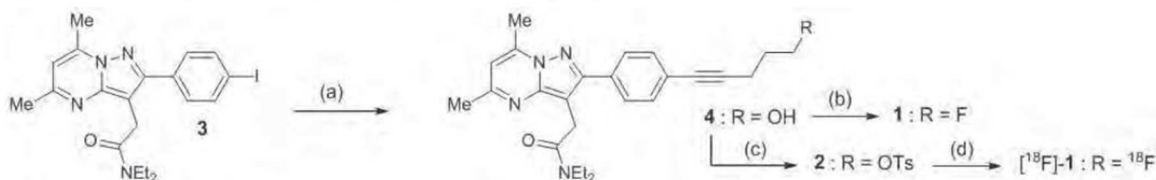
P-207 Synthesis of a novel fluorine-18-labelled analogue of DPA-714, [¹⁸F]DPA-C5yne, for imaging neuroinflammation with PET

Medrán-Navarrete, Vincent¹; Damont, Annelaure^{1*}; Kuhnast, Bertrand¹; Kassiou, Michael³; Boisgard, Raphaël^{1,2}; Dollé, Frédéric¹

¹ CEA, I2BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay, France; ² Inserm, U1023, Université Paris Sud, Orsay, France; ³ Brain and Mind Research Institute, Camperdown, NSW, Australia; University of Sydney, NSW, Australia

Objectives: Overexpression of the TSPO-18 kDa in the brain during microglial cell activation in response to brain insults has attracted considerable attention for the development of PET-radioligands as imaging markers of neuroinflammation. While several radioligands are still currently under development, the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-acetamide [¹⁸F]DPA-714 is today considered as a major challenger to the ligand of reference [¹¹C]PK11195 [1-3]. However, recent in-house studies have demonstrated that this 2-[¹⁸F]fluoroethoxyphenyl derivative is rapidly and extensively metabolized *in vivo* in both rodents and non-human primates with notably formation of fluorine-18-labelled small metabolites resulting from *O*-dealkylation [4]. Therefore, keeping the scaffold of DPA-714, the synthesis of new analogues in which the oxygen atom bridging the phenyl ring and the fluoroalkyl chain is replaced with a carbon would be of interest. Thus, a novel series of fluoroalkyne derivatives has recently been developed including DPA-C5yne (**1**) whose synthesis and labelling with fluorine-18 are reported herein.

Methods: An authentic sample of DPA-C5yne (**1**), as cold standard, as well as the radiofluorination tosylate precursor (**2**) were prepared in six chemical steps from commercially available methyl 4-iodobenzoate. The key intermediate was the 4-iodophenyl-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine **3** which upon Sonogashira coupling with 4-pentyn-1-ol allowed the introduction of the pentynyl linking motif onto the structure. Fluorine-18-labelling of DPA-C5yne (**1**) from tosylate **2**, was performed using a TRACERLab FX N Pro synthesizer (GEMS) and comprised (1) dissolution of the no-carrier-added, dried (activated) K[¹⁸F]F-Kryptofix[®] 222 complex in DMSO (700 µL) containing 4.0 to 4.5 mg of the tosylate **2**; (2) heating the reaction mixture at 100°C for 10 minutes; (3) dilution of the reaction mixture with twice 2 mL of the HPLC mobile phase; (4) pre-purification on a SepPak[®] Alumina NTM cartridge; (5) HPLC purification on a semi-preparative Waters Symmetry[®] C-18 column (eluent: H₂O/MeCN/TFA: 40/60/0.1 (v/v/v)) and (6) SepPak[®] C-18 removal of the HPLC solvents and formulation for *i.v.* injection.



Preparation of DPA-C5yne (**1**), labelling precursor **2**, and [¹⁸F]-**1** : (a) 4-pentyn-1-ol, CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, Et₃NH, r.t., 24 h (69%); (b) DeoxofluorTM, CH₂Cl₂, r.t., 2-4 days (62%); (c) Ts₂O, CH₂Cl₂, TEA, r.t., 3 h (54%); (d) i) K[¹⁸F]F-K₂₂₂, K₂CO₃, DMSO, 100°C, 10 min, ii) cartridge purification (SepPak[®] Alumina NTM), iii) HPLC purification (Waters Symmetry[®] C-18).

Results: Alcohol **4** resulting from Sonogashira coupling of **3** with 4-pentyn-1-ol was either reacted at ambient temperature with deoxofluorTM in CH₂Cl₂ to generate DPA-C5yne (**1**) in 19% yield or with *p*-toluenesulfonic anhydride in CH₂Cl₂ in the presence of TEA to provide labelling precursor **2** in 54% yield. [¹⁸F]DPA-C5yne ([¹⁸F]-**1**) was obtained in 20-25% decay-corrected yields, based on starting [¹⁸F]fluoride. Typically, starting from a 30 GBq cyclotron-produced [¹⁸F]fluoride batch, up to 5.2 GBq of [¹⁸F]-**1**, > 99% radiochemically pure and ready-to-inject, were obtained in 55-60 min and with specific radioactivities ranging from 50 to 75 GBq/µmol.

Conclusions: DPA-C5yne (**1**) was successfully synthesized and labelled with fluorine-18. Comparative PET-imaging (Focus 220 Concorde) with the parent molecule DPA-714 is currently underway in a rat model of neuroinflammation to demonstrate its potential to *in vivo* image the TSPO.

Acknowledgements: Supported by FP7/2007-2013, INMiND (HEALTH-F2-2011-278850)

References: [1] Damont A, et al. (2008) J Label Compd Radiopharm, 51, 286-92. [2] Dollé F, et al. (2009) Curr Med Chem, 16, 2899-923. [3] Kuhnast B, et al. (2012) Appl Radiat Isot, 70, 489-97. [4] Peyronneau M-A, et al. (2013) Drug Metab Dispos, 41, 122-31.

Résumé / Abstract

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectifs la synthèse chimique de nouveaux ligands de la protéine de translocation 18 kDa (TSPO), leur évaluation *in vitro* et le radiomarquage isotopique des candidats les plus prometteurs par l'émetteur de positons à vie brève fluor-18 ($t_{1/2}$: 109,8 minutes). Ce travail a pour finalité le développement de nouvelles sondes moléculaires ou biomarqueurs pour l'imagerie non-invasive et atraumatique par Tomographie par Emission de Positons (TEP) de la neuroinflammation, processus reconnu dans les maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la sclérose en plaque et certaines maladies psychiatriques.

Le radioligand de choix pour l'imagerie de la TSPO est actuellement le [^{18}F]DPA-714, une pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine marquée au fluor-18 récemment développée au laboratoire. Cependant, cette molécule subit *in vivo* la perte rapide de l'atome de fluor radioactif par rupture du motif fluoroalkoxy comme démontrée lors de l'étude de son métabolisme. Mon projet de thèse a donc visé à concevoir et développer de nouveaux dérivés structurellement proches de DPA-714 (analogues) pour lesquelles la liaison entre le squelette principal et le fluor-18 serait renforcée. C'est dans ce cadre que dix-neuf composés ont été préparés et évalués pour leur affinité pour la TSPO, et que deux candidats prometteurs, DPA-C5yne et CfO-DPA-714, ont été radiomarqués au fluor-18 avec de bons rendements radiochimiques (20-30 %) et de hautes radioactivités spécifiques (50-90 GBq/ μmol). Ces radioligands ont également été évalués *in vivo* par imagerie TEP et présentent, chez l'animal, des performances équivalentes voire légèrement supérieures à [^{18}F]DPA-714.

Mots-clés: Chimie médicinale ; Radiochimie ; Fluor-18 ; Imagerie moléculaire ; Tomographie par Emission de Positons ; Neuroinflammation ; TSPO 18 kDa.

The work presented in this manuscript aims to describe the synthesis of new ligands of the translocation protein 18 kDa (TSPO), their *in vitro* evaluation and, for the most promising candidates, their isotopic radiolabelling with the short-lived positron emitter fluorine-18 ($t_{1/2}$: 109.8 minutes). The ultimate goal of this work consists in developing new molecular probes, or biomarkers, for imaging neuroinflammation in a non-invasive and atraumatic manor using Positron Emission Tomography (PET). Neuroinflammatory processes have been identified in Alzheimer and Parkinson diseases, MS and various psychiatric pathologies.

The radioligand of choice for imaging TSPO is currently [^{18}F]DPA-714, a pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine radiolabelled with fluorine-18 which has been recently prepared in our laboratories. However, [^{18}F]DPA-714 undergoes a rapid *in vivo* loss of the radioactive fluorine by cleavage of the fluoroalkoxy chain as demonstrated in metabolic studies. Therefore, my PhD project aimed to design and develop new structurally related analogues of DPA-714 where the linkage between the main backbone and the fluorine-18 would be reinforced. To this extent, nineteen compounds were prepared and their affinity towards the TSPO was evaluated. Two promising candidates, coded DPA-C5yne and CfO-DPA-714, were radiolabelled with fluorine-18 with good radiochemical yields (20-30 %) and high specific radioactivities (50-90 GBq/ μmol). These radioligands were also evaluated by PET imaging at the preclinical stage and displayed equivalent or slightly improved results when compared to [^{18}F]DPA-714.

Key-words: Medicinal chemistry ; Radiochemistry ; Fluorine-18 ; Molecular Imaging ; Positron Emission Tomography ; Neuroinflammation ; TSPO 18 kDa.